



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“INHIBIDORES DE LA ENZIMA LACTATO  
DESHIDROGENASA COMO AGENTES  
ANTIPROLIFERATIVOS Y  
ANTIMETASTÁSICOS”**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**MARIANA ONTAÑÓN SÁNCHEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS**



**CDMX**

**2022**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor: HERNANDEZ LUIS FRANCISCO**

**VOCAL:**            **Profesor: PEREZ MUÑOZ CARLOS**

**SECRETARIO:**    **Profesora: GONZALEZ TRUJANO MARIA EVA**

**1er. SUPLENTE:**   **Profesor: ALFARO ROMERO ALEJANDRO**

**2º SUPLENTE:**     **Profesor: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.**

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_

**DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS**

**SUSTENTANTE (S):**

  
\_\_\_\_\_

**MARIANA ONTAÑÓN SÁNCHEZ**

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Cáncer en México .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Origen y tipos de cáncer .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Características del Cáncer .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Proliferación y metástasis .....	8
1.3.2 Reprogramación metabólica: El efecto Warburg .....	9
<b>1.4 Enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Tratamiento.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Objetivo .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Objetivo general.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Objetivos particulares .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Metodología .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el piruvato .....</b>	<b>14</b>
4.1.1 Oxamato .....	14
4.1.2 PSTMB.....	22
<b>4.2 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el NADH .....</b>	<b>26</b>
4.2.1 Gosipol .....	26
4.2.2 FX11.....	31
4.2.3 Quinolinas 3-sulfonamidas.....	36
<b>4.3 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el piruvato y el NADH.....</b>	<b>42</b>
4.3.1 NHI.....	42
4.3.2 GNE-140 .....	48
<b>4.4 Compuestos cuyo mecanismo de acción es unirse a LDH libre.....</b>	<b>52</b>
4.4.1 Galoflavina .....	52
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>57</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>58</b>

## Resumen

Una de las modalidades utilizadas para el tratamiento del cáncer es la quimioterapia. En el presente trabajo se considera al efecto Warburg: un cambio metabólico que presentan las células cancerosas, que al acelerar la glucólisis generan la energía indispensable para su sobrevivencia. La producción de lactato durante la glucólisis contribuye a la progresión maligna del tumor al reponer  $\text{NAD}^+$ . La enzima encargada de convertir el piruvato en lactato y el  $\text{NADH}$  en  $\text{NAD}^+$ , se llama lactato deshidrogenasa (LDH) por lo que es considerada una diana en la búsqueda de antitumorales. En este contexto el oxamato y el PTSMB (1-(fenilseleno)-4-(trifluorometil) benceno) se presentan como inhibidores que compiten con el piruvato; al gosisol, el FX11 (ácido 2,3-dihidroxi-6-metil-7-(fenilmetil)-4-propilnaftaleno-1-carboxílico), a las quinolinas 3-sulfonamidas, como inhibidores que compiten con el  $\text{NADH}$ ; a los N-hidroxiindoles (NHI) y el GNE-140 (patentado por GSK) como inhibidores que compiten con el piruvato y el  $\text{NADH}$ ; y a la galoflavina como inhibidor de unión a la enzima libre. Todo lo anterior con el propósito de generar un panorama sobre el potencial de esta diana enzimática para encontrar compuestos con acción antiproliferativa sobre células cancerosas y antimetastásicos.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Cáncer en México

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, cerca del 70% de las muertes se registran en países de ingresos medios y bajos, como es el caso de México. Es un problema de salud pública grave y con un impacto económico sustancial (OMS, 2021). El término cáncer es utilizado para describir una serie de enfermedades en donde existen células anormales que se dividen de manera descontrolada y que pueden invadir diferentes tipos de tejidos u órganos encontrados a su alrededor (National Cancer Institute, 2021). Existen diferentes tipos de cáncer y nomenclaturas dependiendo del tejido primario implicado. Esta afectación puede desarrollarse a cualquier edad, y a pesar de que incrementa la probabilidad de adquirir un tumor maligno mientras se incrementa la edad, existen tipos de cáncer que son más frecuentes en la población menor a 20 años, como algunas leucemias, cáncer de hueso y neuroblastomas. En nuestro país, entre los meses de enero y agosto de 2020 se registraron 88,683 defunciones debido a tumores malignos, las cuales representan el 9% de las defunciones totales en México durante este año (INEGI, 2021). Adicionalmente, el número estimado de casos nuevos en este mismo periodo, fue de 195,000 personas, y se espera que para el año 2040 este número incremente a 323,000 casos (OMS, 2021). Nacionalmente, el cáncer de mama tiene la mayor incidencia para el caso de las mujeres y el de próstata para el caso de los hombres, otros de gran importancia para ambos sexos son: cáncer colorrectal, de tiroides, de estómago, leucemia y de pulmón (GLOBOCAN, 2020).

## 1.2 Origen y tipos de cáncer

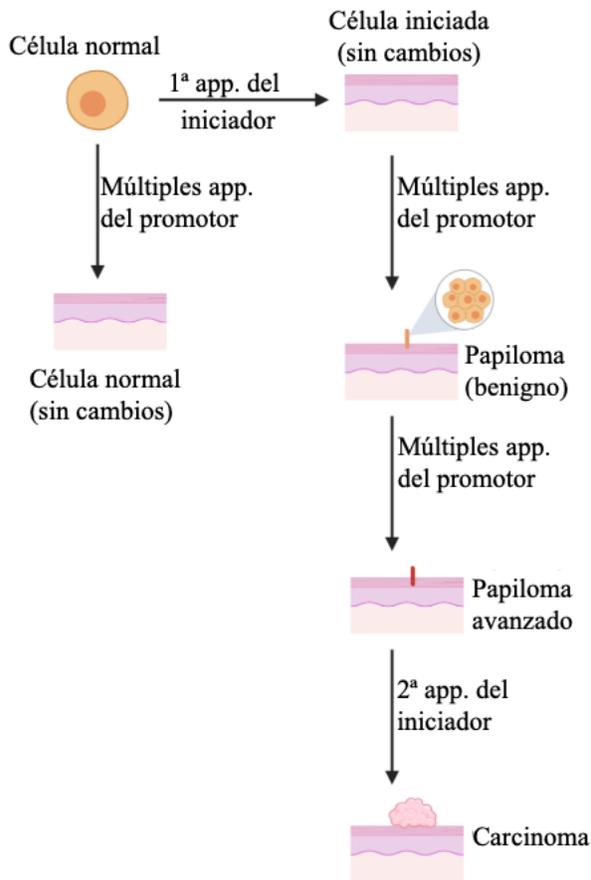
Unas de las preguntas más frecuentes sobre el cáncer son: ¿cómo se origina el cáncer?, ¿qué da cáncer?, ¿cuándo empieza el cáncer? Estas preguntas son tan populares que incluso en la vida cotidiana las personas y los medios mencionan “nuevos” productos o alimentos que “causan cáncer”. Sin embargo, se sabe que el cáncer es de origen genético, la acumulación de mutaciones específicas puede conducir a la carcinogénesis. Para que se induzca el cáncer hay dos etapas: iniciación y promoción.

Los iniciadores de tumores interactúan con el DNA y provocan mutaciones que pueden estar en uno o en varios sitios del genoma. Una célula normal sufre un cambio irreversible que ocasiona la adquisición de un crecimiento autónomo, esta capacidad puede permanecer latente desde semanas

hasta años y la célula puede ser fenotípicamente indistinguible de las otras células en el tejido de interés (Haschek & Rousseaux, 2013). A veces sólo se requiere de una sola exposición, y en otras las exposiciones deben agregarse para formar enlaces covalentes con el DNA y, por lo tanto, causar un efecto irreversible; un buen ejemplo de iniciación tumoral es la radiación, las partículas atómicas, los rayos X y la luz ultravioleta. Estos agentes físicos tienen energía suficiente para llegar al DNA y causar daño, a menos que haya habido exposición a una bomba atómica, la luz ultravioleta es el iniciador más conocido debido al sol (Laikova et al., 2019). La prueba más utilizada para identificar a un iniciador/mutágeno es la de AMES, donde se utilizan cepas de *Salmonella* auxotróficas a histidina (Mortelmans & Zieger, 2000).

Por otro lado, los promotores tumorales interactúan con las células para promover el crecimiento y/o bloquear la diferenciación, un cambio reversible que no es capaz de dañar al DNA como puede hacerlo un iniciador, el cual normalmente se requiere una exposición prolongada. No existe una prueba confiable para identificar estos factores porque generalmente están asociados con factores dietéticos, hormonales, ambientales y relacionados (Haschek & Rousseaux, 2013). Ejemplos de promotores son: hormonas, fármacos, agentes infecciosos, traumatismos físicos o mecánicos, entre otros (Weinberg, 2014).

Existe una relación importante entre un promotor y un iniciador (Figura 1), en la cual debe administrarse un iniciador antes que el promotor. Si se administra únicamente un iniciador, no se desarrollará un tumor primario, y lo mismo ocurre con un promotor. Después de administrar un iniciador y, en consecuencia, un promotor se desarrolla un tumor; si este primer tumor se administra con y sólo con un iniciador se desarrollará un carcinoma (para el caso de este ejemplo). Por tanto, se puede concluir que, si aumenta el número de iniciadores el carcinoma será aún más agresivo. A este último paso en la tumorigénesis se le denomina progresión que, en otras palabras, involucra un crecimiento evolutivo de células en estados progresivamente más malignos (Weinberg, 2014).



**Figura 1: Esquema de iniciación y promoción en ratones.** Un iniciador convierte una célula normal en una célula iniciada, no se ve ningún cambio. Si se agrega un promotor se puede observar un papiloma. La adición de más aplicaciones promotoras avanza al papiloma. Es sólo hasta que se aplica un segundo iniciador cuando aparece un carcinoma. Varias aplicaciones de un promotor a una célula normal no provocan cambios celulares.

Adaptado de: Weinberg, R. A. (2014).

Ahora bien, durante este trabajo se mencionarán estudios con diferentes tipos de cáncer, esta distinción se realiza dependiendo del tejido de origen, por ejemplo: los carcinomas provienen de células epiteliales, los sarcomas de células mesenquimales, las leucemias de células hematopoyéticas y los neuroectodérmicos del sistema nervioso. La mayoría de los casos son carcinomas y se dividen en adenocarcinomas (pulmón, colon, mama, páncreas, estómago, próstata...), carcinomas de células escamosas (piel, pulmón, cervix, esófago...) y otros como carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, carcinoma de pulmón de células pequeñas etc. (Weinberg, 2014).

El DNA es altamente dinámico y tiene múltiples mecanismos de reparación, por lo que debe haber una cantidad muy alta de disrupción en las vías celulares como para poder causar cáncer. Estas características que llevan al cáncer serán descritas a continuación.

### 1.3 Características del Cáncer

En el año 2000, Hanahan y Weinberg publicaron un *review* llamado “*The Hallmarks of Cancer*” que reunía y organizaba todas las complejidades de la biología del cáncer en 6 características principales: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis de tejidos (Hanahan & Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, 2000). Dicho artículo es el más citado de todos los tiempos de la revista *Cell*. Una década después, la información se actualizó añadiendo dos características emergentes: reprogramación metabólica energética y la evasión de la respuesta inmunológica, y dos características de activación: inestabilidad genómica y mutación, e inflamación fomentadora de tumores (Hanahan & Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, 2011). Este trabajo se enfocará en tres de ellas de manera particular: proliferación, metástasis y la reprogramación metabólica energética.

#### 1.3.1 Proliferación y metástasis

Independientemente del tipo de cáncer y del tejido del cual origina el tumor principal, todos terminan con el mismo resultado: un incremento desregulado del número celular y realizando los procesos de invasión y metástasis, por lo que es importante describir brevemente dichos procesos. Las células normales controlan la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento celular (factores de crecimiento) e indican la progresión durante el ciclo celular, dichos puntos claves son llamados *checkpoints*. En cambio, las células cancerígenas logran sostener la señal de proliferación al evadir *checkpoints* del ciclo celular. Sin entrar mucho en detalle pueden lograr esto de diferentes maneras: al producir ligandos de factores de crecimiento, al enviar señales que estimulan células normales y por tanto abastecer a las cancerígenas con factores de crecimiento, y elevar los niveles de receptores proteicos o alterar la estructura de receptores y consecuentemente facilitar el acoplamiento de ligandos (Hanahan & Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, 2011).

La metástasis se describe como la diseminación de células tumorales desde un sitio primario hacia un crecimiento progresivo en un órgano distante. Este proceso es responsable de la mayoría de las muertes de los pacientes con cáncer. Es un proceso extremadamente complejo que se resume en los siguientes pasos: las células activan una transición epitelial-mesenquimal (se pierden las

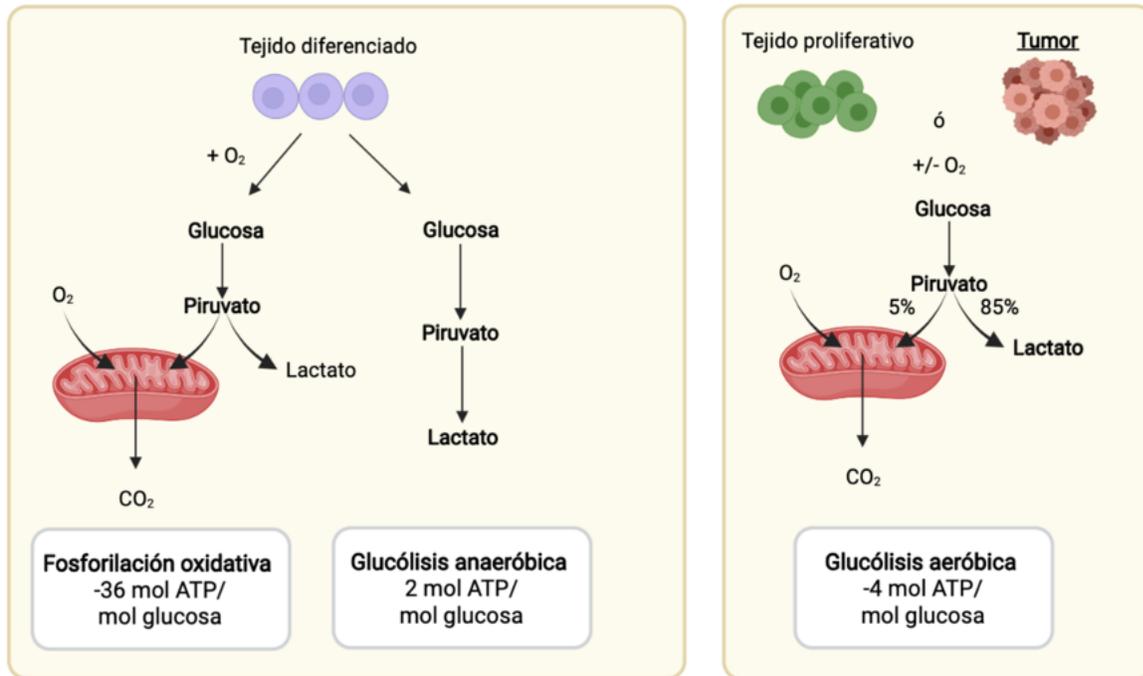
uniones intercelulares), hay una invasión local, intravasación (las células cancerígenas entran al torrente sanguíneo), las células sobreviven en el torrente sanguíneo, hay una extravasación hacia un tejido en particular y el establecimiento en los tejidos del órgano donde sucederá la metástasis. El por qué de esta invasión y la razón por la que algunos tipos de cáncer hacen metástasis en órganos secundarios particulares sigue siendo desconocido. La célula original es transformada a través de mutaciones y parece ser que la dirección del torrente sanguíneo está involucrada. Una vez que el cáncer hace metástasis, controlar este crecimiento y sus consecuencias a través de tratamiento se vuelve más complicado y por eso se le atribuyen alrededor del 90% de las defunciones (Arvelo, Sojo & Cotte, 2016).

### 1.3.2 Reprogramación metabólica: El efecto Warburg

El efecto Warburg fue descrito por un fisiólogo alemán con dicho apellido, quien pensaba que el cáncer era una enfermedad de origen metabólico causada después de la activación de vías energéticas alternas. Aunque su teoría ha sido demostrada como falsa (el cáncer es una enfermedad de origen genético), sus contribuciones han sido extremadamente valiosas, especialmente en los últimos 10 años. El llamado efecto Warburg es un cambio en el metabolismo observado en la mayoría de las células cancerígenas, en el que se prefiere obtener energía a través de la glucólisis y fermentación del lactato, incluso en la presencia del oxígeno, en lugar de la fosforilación oxidativa. Para comprender por qué este cambio es tan particular e interesante hay que recordar algunos aspectos de Biología Celular, comenzando con la premisa de que una célula que se está dividiendo requiere de más energía y de más biosíntesis (Ward & Thompson, 2012).

Al observar la figura 2 podemos hacer un análisis entre lo que pasa en una célula “normal” y en una cancerosa. En presencia de oxígeno, los tejidos que no están proliferando (diferenciados) primero metabolizan la glucosa a piruvato, a través de la glucólisis, y posteriormente oxidan la mayor parte de ese piruvato en las mitocondrias a  $\text{CO}_2$ , este último proceso se le conoce como fosforilación oxidativa. Debido a que el oxígeno actúa como aceptor de electrones en la etapa final para oxidar a la glucosa por completo, el oxígeno es esencial para este proceso. Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir el piruvato generado por la glucólisis hacia la generación de lactato (glucólisis anaeróbica). Esta generación de lactato permite que la glucólisis continúe, pero produce una cantidad mínima de ATP en comparación con la fosforilación oxidativa. Warburg observó que las células cancerosas tienden a convertir la mayor parte de la glucosa en

lactato independientemente de la presencia de oxígeno (glucólisis aeróbica), este efecto también es observado en tejidos proliferativos normales. Las mitocondrias permanecen funcionales y un cierto porcentaje de glucosa continúa por la fosforilación oxidativa tanto en las células cancerosas como en las células en proliferación normales (Vander Heiden, Cantley & Thompson, 2009).



**Figura 2:** Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glucólisis anaeróbica y la glucólisis aeróbica (efecto Warburg). Adaptado de: Vander Heiden, Cantley & Thompson, 2009.

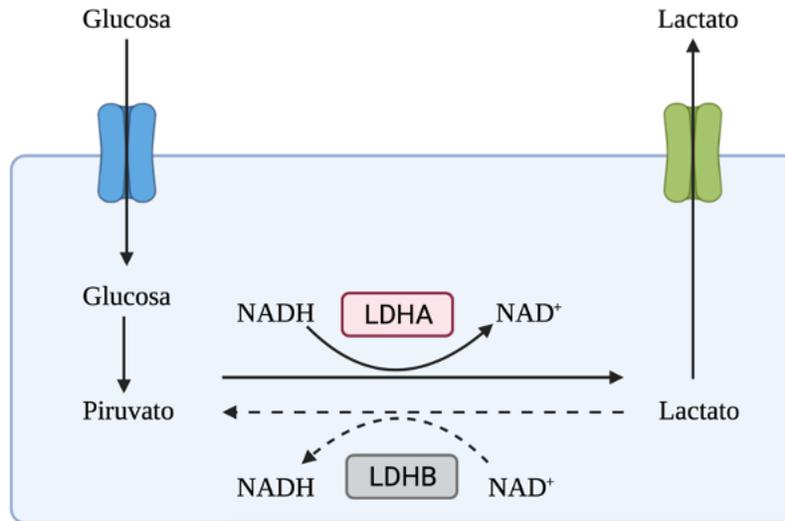
Lo que más destaca de este cambio metabólico es el hecho de que la glucólisis aeróbica es menos eficaz que la fosforilación oxidativa para generar ATP, una explicación de por qué se prefiere esta vía es que una menor producción de ATP es un problema cuando hay pocos recursos, lo cual no es el caso para células proliferativas que están en contacto constante con la glucosa y otros nutrientes. Las células en proliferación requieren de otros recursos además del ATP como: ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos. Por esta razón, las células cancerígenas incrementan la captación de glucosa y frecuencia de la glucólisis para producir una cantidad excesiva de lactato extracelular que afecta el microambiente completo de las células. La concentración fisiológica de lactato en sangre y tejidos sanos es de 1.5-3 mM, y en tejidos cancerosos puede presentarse en concentraciones de hasta 10-30 mM (de la Cruz-López et al., 2019). Esta elevada producción de

lactato ocasiona un decremento en el pH del microambiente; los iones  $H^+$  siendo secretados por las células cancerosas se difunden y acumulan en el espacio extracelular tumoral y ocasionan una mayor invasión y metástasis. Algunas hipótesis son que esto es logrado al inducir angiogénesis, al modificar la estructura de la matriz extracelular, al disminuir la respuesta inmunológica anti-cáncer o al ocasionar una migración intensificada de células tumorales (Thews, O. & Riemann, A., 2019).

En resumen, parece ser que algunas de las ventajas del efecto Warburg, de las cuales se aprovechan las células cancerígenas son: una rápida síntesis de ATP que promueve la biosíntesis de otras macromoléculas importantes para la división celular y la acidificación del microambiente, lo cual favorece la invasión y metástasis, y otorga funciones de señalización a células tumorales al producir metabolitos necesarios para dicho proceso (Liberti & Locasale, 2016).

#### 1.4 Enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima intracelular tetramérica compuesta de las subunidades proteicas M y H, éstas pueden combinarse de 5 maneras diferentes para formar homo o hetero tetrámeros en los tejidos humanos: LDH-1(4H), LDH-2 (3H1M), LDH-3 (2H2M), LDH-4 (1H3M) y LDH-5 (4M). La LDH5, también conocida como LDHA, es la isoforma predominante en el músculo esquelético, la cual reduce el piruvato a lactato y oxida al NADH a  $NAD^+$  (Fig. 3), esta reacción es termodinámicamente favorable. La LDH1 también conocida como LDHB, es la isoforma predominante encontrada en el músculo cardiaco y realiza la reacción contraria a la LDHA (Mishra & Banerjee, 2019). Además, ambas enzimas aseguran la plasticidad metabólica de células neoplásicas, lo que ocasiona que puedan adaptarse a ambientes hostiles o condiciones con mayores concentraciones de especies reactivas del oxígeno, también regulan la muerte celular por apoptosis y autofagia (Pérez-Tomás & Pérez-Guillén, 2020). Es decir, el rol de esta enzima es mucho más relevante de lo que inicialmente se pensó.



**Figura 3:** Esquema mostrando las isoformas más importantes de la enzima lactato deshidrogenasa (LDHA y LDHB) y las reacciones que llevan a cabo dentro de la célula.

Usualmente, la LDH es utilizada como un marcador de daño celular ya que se expulsa cuando dicho proceso ocurre, por lo que la LDH se ha convertido en un posible parámetro diagnóstico y pronóstico de cáncer (Forkasiewicz, et al., 2020). Varios reportes indican que la expresión y actividad de la LDH, especialmente la LDHA, se ve incrementada en varios tipos de tumores y se asocia con un menor índice de supervivencia (de la Cruz-López et al., 2019). Algunos autores encontraron que, al remover quirúrgicamente el tumor primario, hubo un decremento drástico en LDH sérico dentro de la primera semana post-cirugía (Feng et al., 2018). En resumen, numerosos tumores presentan expresiones altas de LDHA lo que contribuye a características malignas y por eso ha sido considerado como una diana prometedor.

Por último, otra ventaja de esta enzima es que la toma de muestra no es invasiva, ya que puede detectarse desde una muestra de saliva, orina o con un simple procedimiento de venopunción, lo cual es favorable para los pacientes. Los ensayos más comunes para medir los niveles de esta enzima se basan en métodos colorimétricos, al monitorear la absorbencia en el rango 430-550 nm; esto es conveniente ya que pueden cuantificarse en una gran variedad de muestras (Forkasiewicz et al., 2020). Tomando en cuenta todo lo anterior, compuestos que inhiben a la enzima se analizarán al unirse a alguno o ambos sitios activos disponibles del piruvato y del NADH.

## 1.5 Tratamiento

Hace 15 años el tratamiento que se le proporcionaba a los pacientes con cáncer estaba basado en el órgano primario siendo atacado, ahora se tienen múltiples tipos de estrategias más personalizadas, ya que se tiene un mayor conocimiento de la biología molecular y tumoral involucrada (Zugazagoitia, et al., 2016). Gracias a esta ampliación en el conocimiento, es posible diseñar nuevas moléculas que actúan sobre dianas moleculares específicas con el objetivo de tener estrategias terapéuticas más efectivas. Dependiendo del tipo de cáncer, los signos y síntomas del paciente, el avance de la enfermedad y más características se pueden llegar a abarcar diferentes tipos de modalidades como: la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia y la quimioterapia (OMS, 2021). El proyecto en cuestión abarca el área de la quimioterapia y en específico como terapia dirigida ya que busca inhibir a la enzima lactato deshidrogenasa. Aunque el conocimiento sobre el cáncer ha incrementado significativamente en los últimos años, aún nos encontramos lejos, y más como país, de ganar la guerra contra el cáncer. La investigación oncológica debe ser una prioridad nacional y global, al igual que el acceso a estas terapias.

## 2. Objetivo

### 2.1 Objetivo general

Presentar la información publicada sobre compuestos que al afectar el funcionamiento de la LDH presentan actividad antiproliferativa o antimetastásica en células cancerosas, la recopilación se hará mediante la búsqueda en bases de datos de artículos publicados entre los años 2000–2020.

### 2.2 Objetivos particulares

- Examinar la información publicada en las plataformas PubMed y Google Scholar sobre compuestos antiproliferativos y antimetastásicos que compiten con el piruvato.
- Indagar la información publicada en las bases de datos PubMed y Google Scholar sobre compuestos antiproliferativos y antimetastásicos que compiten con el NADH.
- Analizar las publicaciones emitidas en artículos ubicados en las plataformas PubMed y Google Scholar sobre compuestos antiproliferativos y antimetastásicos que se unen a la enzima LDH.

### 3. Metodología

La búsqueda de artículos y revistas que incluyeran información sobre compuestos inhibidores de la LDH con efectos antiproliferativos y antimetastásicos fue realizada utilizando las herramientas PubMed y Google Scholar acotando la búsqueda a los años 2000-2021 con excepción de artículos de años anteriores que sólo describen propiedades de alguna molécula. Sólo fueron incluidos aquellos publicados en el idioma inglés. Primeramente, se realizó un filtro donde sólo se leyeron los títulos y *abstracts* de los artículos encontrados, posteriormente en la bibliografía de dichos artículos se encontraron y consideraron otras referencias que pudieran considerarse de utilidad. Algunos ejemplos de palabras claves para la búsqueda en estas plataformas son: (LDH) y (inhibitor/inhibition) y (cancer) o (metastasis) o (proliferation) o (tumor) o (effect), o (competition) y (pyruvate) o (NADH) y (LDH), (antimetastatic) y (LDH) o (antiproliferative) y (LDH). Al encontrar información relevante de un compuesto se utilizaron las palabras anteriores en combinación con el nombre del compuesto, por ejemplo: (oxamate) y (LDH) o (tumor) y (metastasis) o (proliferation), etc.

Los criterios de inclusión consideran que la publicación del compuesto incluya efectos antiproliferativos y antimetastásicos y contenga datos como tablas o gráficas para poder sustentar la información. De igual manera, se sopesaron artículos que mencionan cualquier tipo de cáncer y/o línea celular y que sean estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. No se utilizaron *reviews*, excepto cuando se ocuparon para referirse a información general sobre la diana en cuestión o alguno de los compuestos utilizados. Una vez que se obtuvieron los artículos relevantes para cada tipo de mecanismo, se creó una tabla con columnas especificando el tipo de estudio, línea celular, y resultados principales con el propósito de incorporar toda la información de manera más clara.

### 4. Resultados y discusión

#### 4.1 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el piruvato

##### 4.1.1 Oxamato

##### **Generalidades**

El oxamato es un análogo estructural del piruvato (Fig. 4), al competir con éste inhibe la actividad de la LDH y por lo tanto la conversión de piruvato a lactato (Valvona & Filmore, 2018). Algunos

estudios han revelado que bloquear a la isoforma LDHA sólo inhibe la glucólisis aeróbica en células tumorales, mas no en células normales, por lo que esta sección se concentrará en la inhibición de dicha isoforma (Liu, et al., 2014). El oxamato ha sido estudiado como un clásico inhibidor de la enzima en cuestión; sin embargo, falta elucidar su uso terapéutico para disminuir procesos como la proliferación y la metástasis.

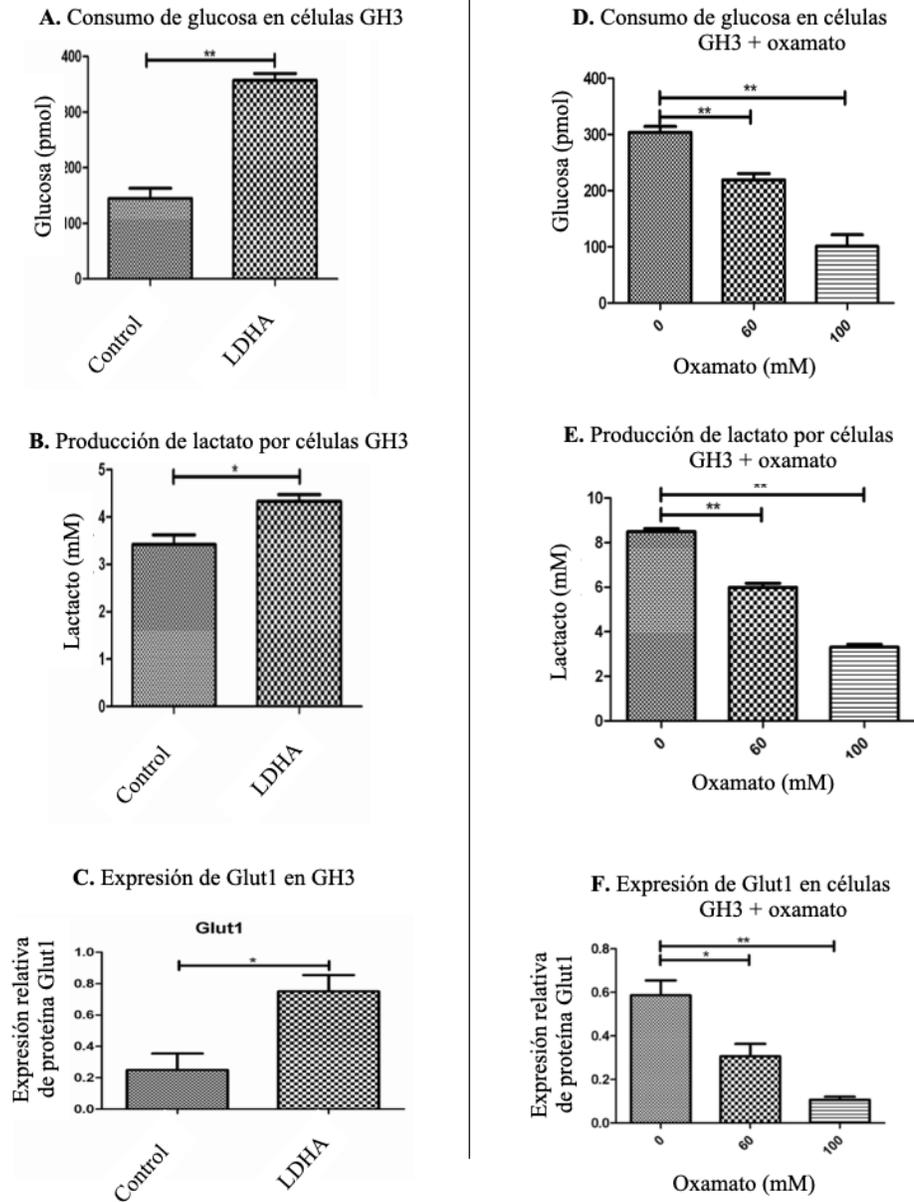


**Figura 4:** Similitud estructural entre el piruvato y el oxamato.

---

### **Inhibición de la LDHA**

En un estudio realizado por An *et al.* (2017), enfocado en células de adenoma pituitario (GH3), los efectos de la LDHA se observaron sobre el consumo de glucosa (Fig. 5A), la secreción de lactato (Fig. 5B) y la expresión del transportador de glucosa GLUT-1 (Fig. 5C). Al utilizar concentraciones de 0, 60 y 100 mM de oxamato se observaron menores niveles de consumo de glucosa (Fig. 5D), secreción de lactato (Fig. 5E) y expresión de GLUT-1 (Fig. 5F). El transportador GLUT-1 humano es responsable de la absorción de glucosa en células, especialmente en eritrocitos, células epiteliales y músculo cardiaco (Galochkina, Ng Fuk Chong & Challali, 2019). Considerando el efecto Warburg, tiene sentido que si existe una mayor expresión de LDHA se requiera de una mayor expresión de GLUT-1, la enzima LDHA convierte el piruvato en lactato y en consecuencia hay menor piruvato disponible para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, esto ocasiona que se requiera más glucosa dentro de la célula.

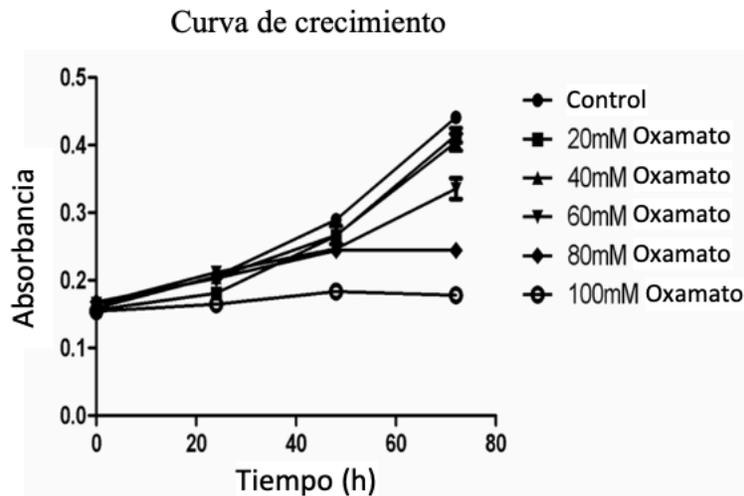


**Figura 5: Efectos metabólicos en células de adenoma pituitario (GH3) con y sin tratamiento de oxamato.** (A) El histograma representa el consumo de glucosa por un grupo control de células GH3 y otro conteniendo un vector de LDHA. (B) El histograma representa la producción de lactato por un grupo control de células GH3 y otro conteniendo un vector de LDHA. (C) El histograma representa la expresión de Glut1 por un grupo control de células GH3 y otro conteniendo un vector de LDHA. (D) El histograma respresenta el consumo de glucosa de células de adenoma pituitario después de adicionar 0, 60 y 100 mM de oxamato. (E) El histograma respresenta la producción de lactato por células de adenoma pituitario después de adicionar 0, 60 y 100 mM de oxamato. (F) El histograma representa la expresión de Glut1 en células de adenoma pituitario después de adicionar 0, 60 y 100 mM de oxamato. (An et al., 2017). \*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

Las figuras 5A, B y C muestran el comportamiento esperado al contener un vector de LDHA. Ahora bien, del lado derecho de la figura 5 se observan efectos significativos al añadir oxamato, puede verse que el comportamiento es dosis dependiente. El oxamato a esas concentraciones logra revertir el efecto del vector de LDHA.

### Efectos antiproliferativos del oxamato

Al analizar el efecto antiproliferativo del oxamato, algunos autores obtuvieron resultados *in vitro* indicando que para células de adenoma pituitario (GH3) dicho efecto ocurre de manera dosis dependiente (Fig. 6). Posteriormente justifican que la causa es un arresto en el ciclo celular, específicamente en las etapas G0/G1 (An et al., 2017; Valvona & Filmore, 2018). Inhibir a la LDHA y por ende a la glucólisis aeróbica ocasiona una gran reducción en la producción de ATP y consecuentemente la velocidad con la que las células cancerígenas proliferan (Valvona & Filmore, 2018). Es interesante ver en la gráfica inferior, que aunque todas las concentraciones ocasionan una reducción en el crecimiento en comparación con el control, la pendiente del crecimiento en el tiempo disminuye mientras la concentración de oxamato incrementa, la forma



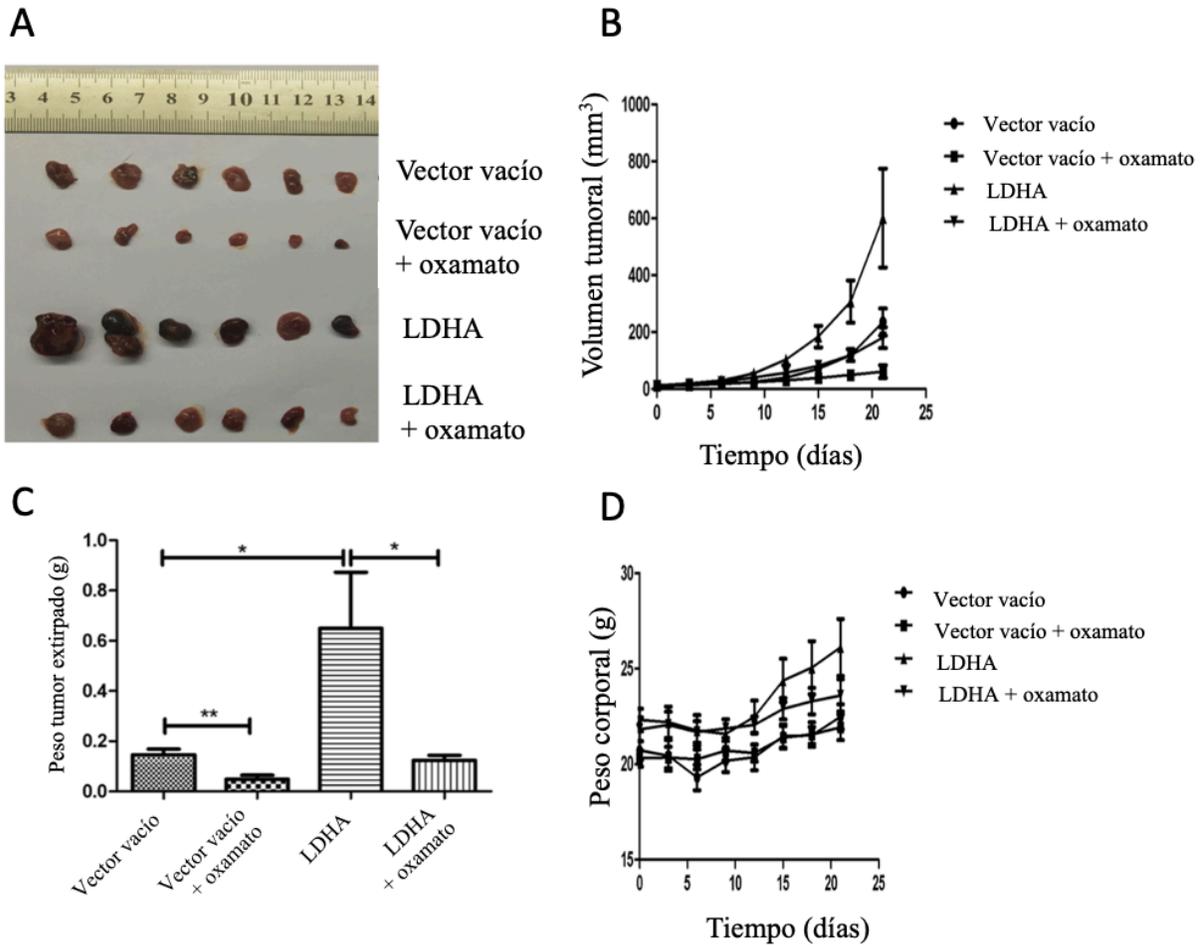
**Figura 6:** Prueba de proliferación celular en células GH3 incubadas con diferentes concentraciones de oxamato durante 0, 24, 48 y 72 h, donde n=3 (An et al., 2017; Valvona & Filmore, 2018).

---

sigmoide típica de una curva de crecimiento parece verse afectada, aunque deberían de mostrarse más datos para realizar conclusiones.

Ahora bien, una manera de evaluar la proliferación celular en cáncer de manera macroscópica *in vivo* es analizar el tamaño del tumor bajo diferentes condiciones. An *et al.* (2017), observaron el crecimiento de tumores al generar modelos de xenoinjertos (ratones) con inyecciones subcutáneas (750 mg/kg) durante 9 días conteniendo el control vacío de GH3 o con células sobrepresando LDHA. Los ratones fueron divididos en 4 grupos (vector vacío, vector vacío + oxamato, LDHA y LDHA + oxamato). Los resultados mostraron que aquellos ratones con una sobrepresión de LDHA promovieron significativamente el crecimiento del tumor, mientras que los que fueron inyectados con oxamato detuvieron significativamente el crecimiento tumoral (Fig. 7) (An *et al.*, 2017).

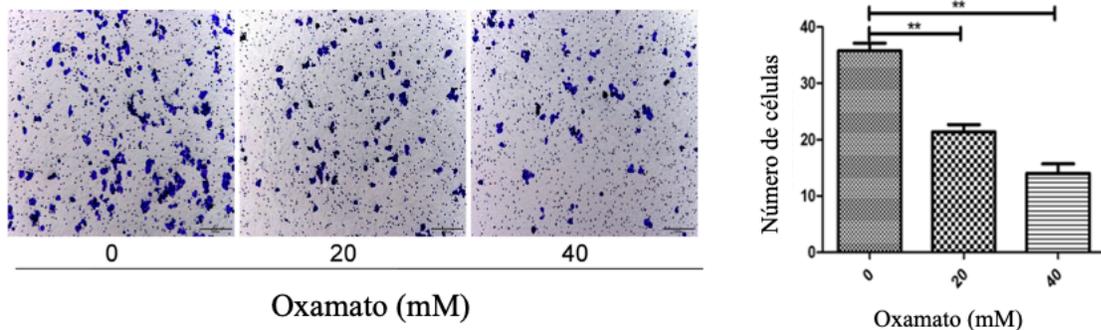
Una imagen como la mostrada en la figura 7A es poco común en revistas científicas, pero proporciona una ayuda visual diferente a las gráficas 7B y 7C. Lo primero que se observa en la imagen y las gráficas de esta figura es que las células sin vector de LDHA más oxamato redujeron su volumen y peso de manera significativa. El efecto antiproliferativo del oxamato se presenta aun cuando no exista una sobrepresión de la enzima LDHA. Los autores justificaron dicho comportamiento con el hecho de que el oxamato promueve la apoptosis en las células en cuestión (GH3), es decir que además de detener la proliferación induce la muerte celular. Sería importante encontrar resultados del efecto del oxamato en células “normales” para observar si la proliferación y apoptosis de estas células “sanas” también son afectadas de manera significativa, ya que esos efectos no serían benéficos clínicamente. Independientemente del efecto que tuvo el oxamato sobre estas células, es evidente el efecto que tiene la sobrepresión de la LDHA sobre el tamaño del tumor. Esto resulta prometedor y motivante para encontrar compuestos como el oxamato que inhiban a la LDHA y consecuentemente detengan el crecimiento de los tumores.



**Figura 7:** Resultados de estudio in vivo. (A) Tumores extirpados de ratones inyectados con un vector vacío o con LDHA y adicionados sin y con oxamato. (B) Curva de crecimiento mostrando el cambio en el volumen tumoral después de la administración de un vehículo o de oxamato. (C) Peso tumoral de cada grupo de ratones. (D) Fluctuaciones en el peso corporal de los ratones de cada grupo estudiado (An et al., 2017). \* $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$

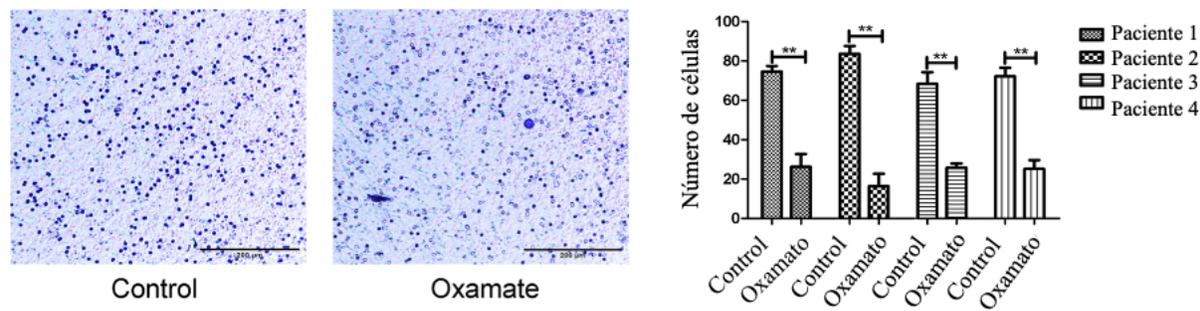
### Efectos antimetastásicos del oxamato

En el mismo estudio realizado por An *et al.* (2017) se describió un subtipo de adenoma pituitario que invade huesos, senos nasales y la dura mater (meninge exterior); es decir, que causa metástasis y por lo tanto causa más proliferación. Los autores adicionaron concentraciones de 0, 20 o 40 mM de oxamato a las mismas células y recabaron que dicha inhibición es concentración dependiente: a mayor dosis menor invasión celular (Fig. 8).



**Figura 8.** Invasión celular en células de adenoma pituitario después de adicionar 0, 20 y 40 mM de oxamato. Observado con aumento de x100 (An et al., 2017). \*\*P <0.05

Posteriormente, los autores realizaron un análisis *in vivo* de la invasión de células de adenoma pituitario, en este caso se obtuvieron células de 4 pacientes con dicho cáncer, a través de biopsias y después se trataron con oxamato durante 48 h. Apoyando los resultados *in vitro* hubo una supresión de la invasión en todos los cultivos (Fig, 9) (An, et al., 2017).



**Figura 9.** Invasión celular en células de adenoma pituitario después de ser expuestas a oxamato. Observado con aumento de x100 (An et al., 2017). \*\*P <0.05

La manera en la que se identificaron las células migrantes, tanto en la figura 8 como en la 9, fue a través de un ensayo de migración de Transwell. Este sistema utiliza una cámara de plástico sellada en un extremo con una membrana porosa, dicha cámara está suspendida sobre un pozo más grande conteniendo un medio nutritivo. Después de colocar las células dentro de la cámara se incubaron durante 48 h ocasionando que las células migrantes se ubicaran en el pozo, una vez que ocurre esto se tiñen con una solución, que en este caso fue cristal violeta. Aunque este tipo de ensayos son muy útiles para analizar la migración y posible metástasis de células, como cualquier ensayo *in*

*vitro*, existen limitaciones dependientes de la experiencia del analista y la técnica específica utilizada.

Ahora bien, en otro artículo donde también se discute la inhibición de la metástasis tumoral al tratar células cancerosas (en este caso de carcinoma renal) con oxamato, dicho efecto fue confirmado al obtener resultados con menores niveles de actividad de LDHA, utilización de glucosa y producción de lactato (Zhao et al., 2017). Dichos autores proponen que esto sucede al inhibir el evento vital de transición epitelial-mesenquimal, también llamado EMT (por sus siglas en inglés). Otros autores, encontraron que el oxamato inhibió significativamente la velocidad de la migración celular de meduloblastomas, lo cual sería de gran beneficio para reducir las consecuencias de la naturaleza metastásica del cáncer (Valvona & Filmore, 2018).

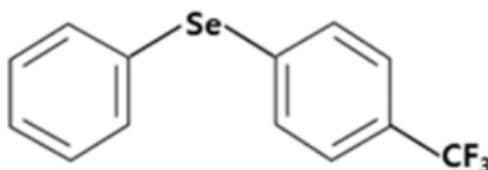
### **Limitaciones del oxamato**

En un estudio en donde el objetivo principal era explorar al oxamato como blanco terapéutico para meduloblastomas y donde encontraron propiedades antiproliferativas y antimetastásicas, entre algunas otras relevantes, reportaron que aunque éstas son prometedoras, la concentración de oxamato necesaria para tener efectos significativos clínicamente son demasiado altos como para ser considerado (Valvona & Filmore, 2018). La dosis efectiva de este compuesto es muy alta como para realizar una administración *in vivo* debido a la limitada permeabilidad de la membrana (Feng, et al., 2018). Sosteniendo los comentarios de los autores anteriores, durante toda la exposición de este compuesto se han encontrado efectos importantes pero todos siendo en concentraciones milimolares. Debido a que el oxamato presenta una estructura altamente polar, se requiere de concentraciones altas para poder atravesar la membrana celular. Por el otro lado, a causa de que el oxamato es un análogo del piruvato, existe la posibilidad que también inhiba otras reacciones esenciales en donde sea necesario. Independientemente de las diversas limitaciones que presenta este compuesto, derivados se siguen investigando y se siguen sintetizando con el propósito de entender la inhibición de la LDH y también le otorga un valor potencial para predecir la eficacia de otros posibles inhibidores de esta enzima.

#### 4.1.2 PSTMB

##### Generalidades

El compuesto: 1-(fenilseleno)-4-(trifluorometil) benceno, PSTMB (Fig. 10) por sus siglas en inglés, inhibe a la LDHA al actuar como un inhibidor alostérico; modifica el sitio activo del piruvato y a través de cambios conformacionales modifica e inhibe la actividad de dicha enzima (de la Cruz-López et al., 2019).



**Figura 10:** Estructura del PSTMB

##### Inhibición de la LDH

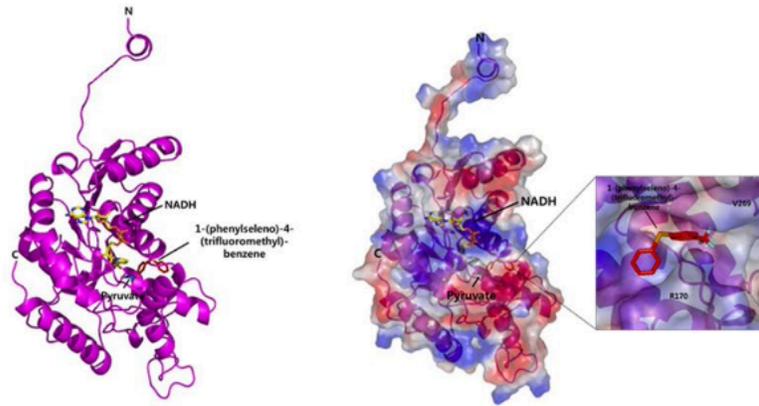
Algunos autores realizaron una validación *in silico* para poder comparar la afinidad entre el piruvato, oxamato o PSTMB, versus la enzima LDHA (Tabla 1) (Kim et al., 2019). Analizando estos resultados, la energía de unión del PSTMB se observa menor que la del oxamato y el propio piruvato, esto indica que dicha molécula se une a la LDHA de manera más eficiente. Adicionalmente, el valor sin NADH muestra que el PTSMB no depende del cofactor NADH para poder unirse a la LDHA y por tanto inhibir su actividad. Ambas aseveraciones también aplican para el oxamato pero el PTSMB muestra una menor energía que éste.

**Tabla 1:** *Docking scores* de compuestos activos y LDHA con o sin NADH (Kim et al., 2019).

Compuesto	Docking score (kcal/mol)	
	LDHA con NADH	LDHA sin NADH
Piruvato	-3.8	-3.5
Oxamato	-4.5	-4.1
PSTMB	-5.9	-6

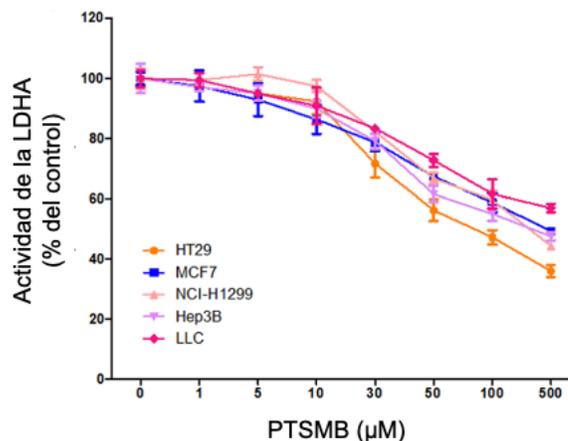
Adicionalmente, dichos autores modelaron la unión del PTSMB a la LDHA (Fig. 11) encontrando que el inhibidor se coloca en el sitio/orificio opuesto al sitio activo del piruvato y en una

orientación y ángulo diferente a éste. Toda esta interacción ocasiona cambios conformacionales que terminan inhibiendo la función del complemento LDHA-NADH (Kim et al., 2019).



**Figura 11: Formación y modelaje del complejo LDHA con NADH, piruvato, o PTSMB.** El inhibidor PSTMB se une a la LDHA en el sitio/orificio opuesto del sitio activo del piruvato. La distribución relativa de la carga superficial se muestra con la región ácida en rojo, la región básica en azul y la región neutra en blanco. (Kim et al., 2019)

Posteriormente, el efecto del PSTMB se analizó en diferentes líneas celulares cancerígenas incluyendo: cáncer de colon (HT29), pulmonar (NCI-H1299), de mama (MCF-7), carcinoma hepatocelular (Hep3B) y cáncer murino pulmonar (LLC). Los resultados mostraron una inhibición dosis dependiente hacia la actividad de la enzima (Fig. 12) (Kim, et al., 2019). Como se aprecia a través de este trabajo, no es común que al analizar múltiples líneas celulares se obtengan resultados



**Figura 12: Inhibición de la actividad de la LDHA.** Las diferentes líneas celulares fueron tratadas con distintas concentraciones de PSTMB por 24 h (Kim et al., 2019)

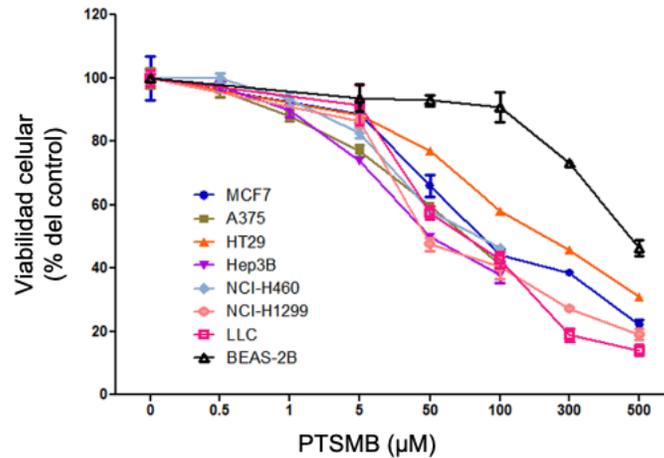
positivos para todos los casos, incluso, es una de las razones por las cuales los investigadores se enfocan en un tipo de cáncer y/o línea celular. Es por ello que resulta bastante prometedor que para todas las líneas celulares exista una inhibición de la actividad de la LDHA, especialmente porque esta inhibición ocurre tanto en hipoxia como condiciones normales y se inhibe la actividad, mas no la expresión.

### **Efectos antiproliferativos del PSTMB**

Los mismos autores realizaron una evaluación sobre el efecto antiproliferativo del PSTMB en líneas celulares humanas y murinas (Tabla 2, Fig. 13). Los resultados mostraron efectos citotóxicos en varias de las líneas celulares, excepto en células bronquiales humanas (BEAS-2B). Posteriormente, los autores elucidaron que dicho efecto se potencia debido al incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno y la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial (Kim et al., 2019). El incremento de las especies reactivas del oxígeno reduce la estabilidad de la mitocondria, lo que lleva a la inducción de la vía intrínseca de apoptosis. La línea celular BEAS-2B está siendo utilizada como un modelo no tumorigénico; es decir, el objetivo de incluir esta línea celular es saber la toxicidad que habría a nivel de epitelio pulmonar si se considerara el uso del PSTMB, dicho efecto resulta ser limitado, y por lo tanto, el PSTMB vuelve a considerarse como un compuesto prometedor.

**Tabla 2: Efecto citotóxico de PSTMB en varias líneas celulares** (Kim et al., 2019).

<b>Línea celular</b>	<b>Origen</b>	<b>CI<sub>50</sub> (μM )</b>
NCI-H460	Célula humana de cáncer de pulmón	74.26 ± 2.17
NCI-H1299	Célula humana de cáncer de pulmón	45.33 ± 1.94
MCF-7	Célula humana de cáncer de mama	84.3 ± 1.92
Hep3B	Célula humana de carcinoma hepatocelular	45.33 ± 2.22
A375	Célula humana de melanoma	62.45 ± 2.24
HT29	Célula humana de cáncer de colon	73.34 ± 1.04
LLC	Célula ratón Lewis de cáncer de pulmón	74.87 ± 1.22
BEAS-2B	Célula humana normal de epitelio bronquial	>300



**Figura 13:** Efecto antiproliferativo del PSTMB. Las diferentes líneas celulares fueron tratadas con distintas concentraciones de PSTMB por 48 h (Kim et al., 2019).

### Efectos antimetastásicos del PSTMB

Por el momento no existe información o resultados enfocados en esta actividad en particular, pero la inducción de la formación de especies reactivas del oxígeno y los efectos antiproliferativos, podrían ser una buena señal para un posible efecto metastásico aunque habría que esperar resultados al respecto.

### Limitaciones del PSTMB

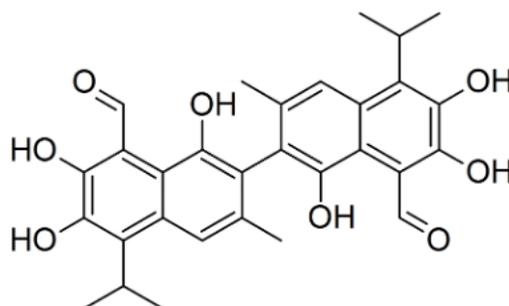
Debido a que el único reporte publicado es el de Kim *et al.*, no se han encontrado limitaciones con los resultados obtenidos hasta el momento, ya que se enfocan en estudios *in vitro* y no se han encontrado resultados en modelos *in vivo* para analizar posibles efectos clínicos. Sin embargo, aunque las concentraciones inhibitorias necesarias son menores que las del oxamato, siguen siendo altas en comparación con otros compuestos que serán mencionados en este trabajo.

## 4.2 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el NADH

### 4.2.1 Gosipol

#### Generalidades

El gosipol es un inhibidor competitivo de la unión LDH-NADH, de naturaleza polifenólica, encontrado en concentraciones altas y de manera natural en las glándulas pigmentarias de la planta del algodón: *Gossypium*. Sus propiedades farmacocinéticas y toxicológicas son conocidas ampliamente debido a su estudio como anticonceptivo oral masculino, y como antitumoral desde los años 90's (Shelley et al., 1999).



**Figura 14:** Estructura del gosipol

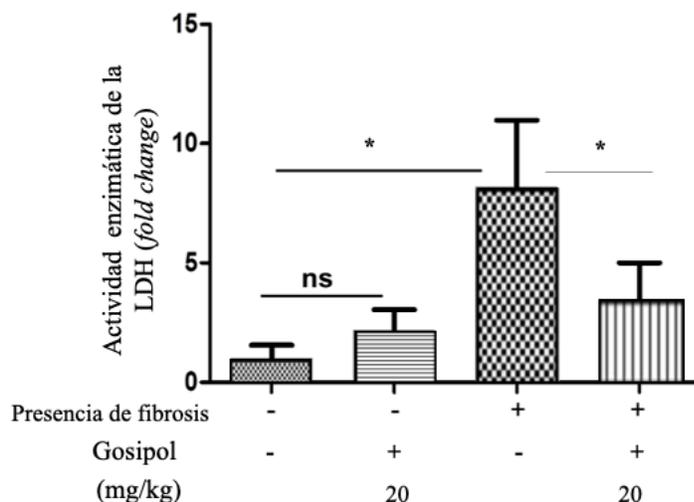
---

#### Inhibición de la LDH

Fue el primero descrito como inhibidor de la isoforma LDHC (requerida para la expresión de proteínas en espermatozoides), pero se ha estudiado para el resto de las otras isoformas, ya que la LDHA y LDHB son las que son más asociadas al efecto Warburg (Yu et al., 2001). En un estudio realizado *in vivo* en ratones con fibrosis pulmonar\* inducida se administraron dosis de 5, 10 o 20 mg/kg o un vehículo durante 21 días y después se realizó una eutanasia. Los resultados mostraron una inhibición significativa de la actividad de la LDH en el día 21 (Fig. 15) (Judge et al., 2018). Cabe recordar que en el estudio *in vivo* mencionado en este trabajo, realizado con oxamato también con ratones, usaron 750 mg/kg para observar los efectos antiproliferativos. Aunque en ese caso era para medir y pesar el volumen de los tumores, la diferencia de dosis en comparación con el gosi-

\*La fibrosis pulmonar está asociada al cáncer de pulmón con invasión maligna

pol es más o menos 30 veces mayor. Es posible que el gosipol tenga mejores oportunidades para poder ser considerado clínicamente, o por lo menos debe haber menos problemas con la permeabilidad de la membrana.



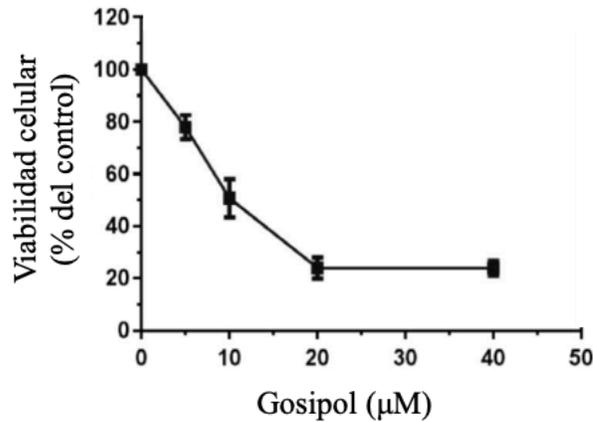
**Figura 15:** Inhibición de la actividad de la LDH al ser tratados con gosipol; con o sin la presencia de fibrosis inducida en ratones. (Judge et al., 2018) \*P<0.01

Ahora bien, la gráfica superior indica que en células sin fibrosis el efecto del gosipol no es significativo, por lo que también resulta prometedor que su inhibición no afectaría a células normales. Posteriormente, es notoria la gran diferencia entre la actividad de la LDH de las células sin fibrosis y aquellas con fibrosis, lo cual indicaría que diagnosticar o predecir fibrosis pulmonar con niveles de LDH sería un buen marcador. Por último, existe una diferencia significativa en la actividad enzimática al añadir 20 mg/kg de gosipol.

### Efectos antiproliferativos del gosipol

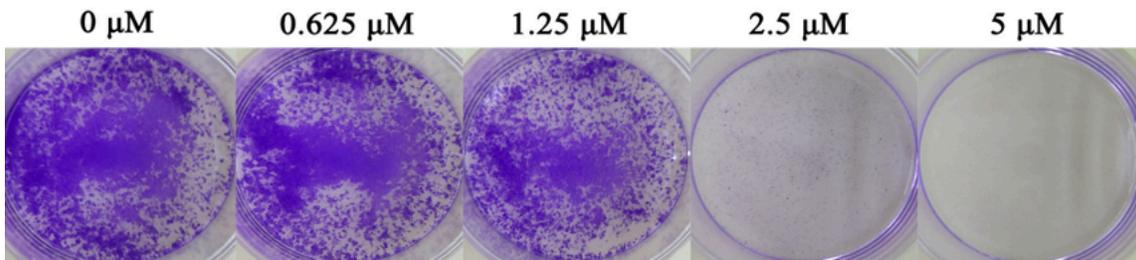
En un estudio enfocado en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se trató a la línea celular H1975 con varias concentraciones de gosipol (0, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ ) durante 72 h para evaluar viabilidad celular (Fig. 16), y durante 14 días para la formación de colonias (Fig. 17). En este segundo ensayo se utilizaron 3 veces menos células que en el primero (Wang, et al., 2018). La viabilidad celular mide la proporción de células vivas y sanas dentro de una población. En cambio, un ensayo de formación de colonias evalúa la habilidad de células individuales para

sobrevivir y reproducirse para formar colonias. Estos dos bioensayos evalúan diferentes aspectos de la proliferación.



**Figura 16:** Evaluación de la proliferación celular de H1975 después de tratarse con 0, 5, 10, 20 y 40 µM de gosipol (Wang et al., 2018).

---



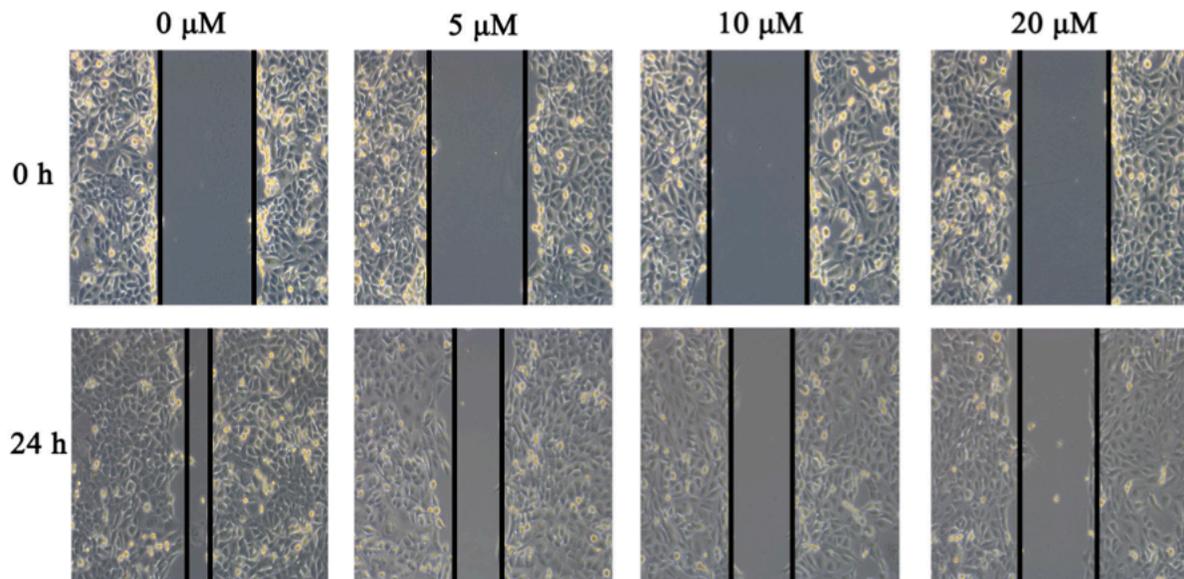
**Figura 17:** Formación de colonias de células H1975 monitoreadas durante 14 días después de tratamientos con gosipol (0-5 µM) teñidas con cristal violeta (Wang et al., 2018).

---

El gosipol inhibió de manera concentración dependiente tanto la viabilidad celular de la línea celular estudiada como la capacidad de formar colonias, es decir tiene un efecto antiproliferativo significativo. Para el ensayo de viabilidad celular la concentración inhibitoria calculada fue de  $10.89 \pm 0.84 \mu\text{M}$ , complementario a esto, la  $CI_{50}$  de células de pulmón normales fue de  $35.26 \pm 1.09 \mu\text{M}$  donde existe una ventana de toxicidad a considerar.

## Efectos antimetastásicos del gosipol

Ahora bien, en el mismo reporte realizado en 2018 por Wang *et al.*, se estudió el efecto antimetastásico del gosipol en células tumorales (H1975), al realizar un ensayo de cicatrización donde se observó que aquellas células tratadas con gosipol redujeron la tasa de cicatrización de manera concentración dependiente (Fig. 18). El ensayo de cicatrización/sanación de herida (*wound healing essay*) está conformado de una mono capa de células a las cuales se les genera una ranura/espacio de manera artificial, normalmente con la punta de una micropipeta; el movimiento se observa bajo un microscopio. La figura a continuación muestra en la parte superior el espacio inicial y debajo el espacio después de 24 h, el control o concentración 0 muestra un cambio bastante significativo entre el tamaño a las 0 y 24 h y, como siempre, funciona como una buena referencia visual para comparar con el resto de las imágenes. Es notorio que, a mayor concentración, el espacio entre las dos secciones de células incrementa y, por tanto, hay una disminución en la migración. En resumen, el gosipol inhibe la habilidad migratoria de las células H1975, la diferencia entre el tiempo 0 y a 24 h al utilizar una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de gosipol fue mínima.



**Figura 18:** Ensayo de curación de herida de células H1975 después de ser tratadas con 0, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de gosipol por 24 h (Wang et al., 2018).

---

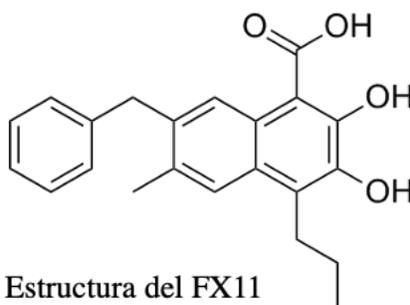
## Limitaciones del gosipol

El mayor problema con esta molécula es que no es selectiva, al ser un producto natural presenta múltiples actividades biológicas como el ser antitumoral, antioxidante, antiviral, antiparasitario. Además, existe en dos formas enantioméricas, en donde la forma (R) es más potente que el isómero (S) con un valor de  $CI_{50} = 20 \mu M$  en melanoma, cáncer de pulmón, de mama, cervical y leucemias, pero presenta niveles de toxicidad preocupantes. Esta toxicidad no selectiva puede relacionarse con lo altamente reactiva que es la estructura, donde los dos grupos aldehído y los grupos hidroxilos son altamente sensibles a la generación de metabolitos tóxicos. Aunque la  $CI_{50}$  del gosipol es mucho más adecuada que la del oxamato, se han finalizado fase I/II en pacientes con diferentes tipos de cáncer debido a toxicidades inaceptables (Rani & Kumar, 2016). Este compuesto es poco soluble en agua y debido a su estructura presenta 5 pKa, ocasionando que la inhibición de la LDH sea altamente dependiente del pH: a menor pH menor concentración de gosipol. En otras palabras, los cambios en los estados de protonación del gosipol contribuyen a cambios en la inhibición de la LDH (Finch, 2017). Lo anterior afecta y debe considerarse si se llegaran a realizar estudios de biodisponibilidad, no poder controlar el pH del medio durante la administración y distribución del fármaco ocasionaría más problemas de toxicidad y/o efectos no deseados. Desafortunadamente por todas las razones anteriores el gosipol ha dejado de desarrollarse, aunque continúan estudios para seguir evaluando sus propiedades y observar si pueden desarrollarse análogos en donde estos problemas sean disminuidos, pero sin afectar sus efectos antiproliferativos y antimetastásicos.

#### 4.2.2 FX11

##### Generalidades

Tomando en cuenta las limitaciones mencionadas del gospol se comenzaron a evaluar análogos de éste con el propósito de encontrar compuestos más seguros y efectivos. Uno de ellos es el FX11 (Fig. 19; [ácido 2,3-dihidroxi-6-metil-7-(fenilmetil)-4-propilnaftaleno-1-carboxílico]), el cual también compite con el NADH para inhibir a la enzima LDH (Feng et al., 2018).



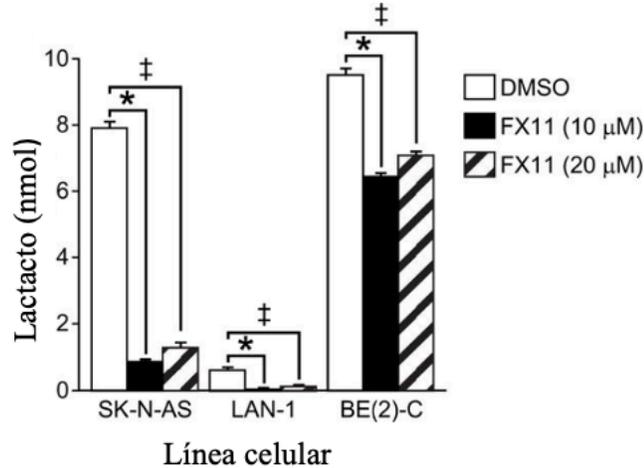
**Figura 19:** Estructura del FX11

---

##### Inhibición de la LDH

Al medir la producción de ácido láctico en tres líneas celulares de neuroblastomas, 24 h después de un tratamiento con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de FX11, y usando DMSO como control, se encontró una disminución de la producción de lactato en todas las líneas celulares (Fig. 20) (Rellinger et al., 2017). Aunque esto sucedió para las 3 líneas celulares, el nivel de inhibición/ producción de lactato para la línea BE(2)-C es mucho menor que para las otras 2 líneas (SK-N-AS:89%, LAN-1: 95%, BE(2)-C: 32%). La diferencia entre esta línea y las otras dos es que tanto SK-N-AS como LAN-1 expresan altos niveles de LDHA, mientras que BE(2)-C expresa menores niveles de LDHA. Lo interesante de estos resultados es que se podría pensar que debido a una menor expresión de LDHA por parte de esa línea celular, los niveles iniciales/del control serían menores y, por tanto, en la gráfica se vería menor la inhibición, pero eso no sucede. Los niveles control de lactato son similares a los de la línea SK-N-AS que tiene altos niveles de expresión de LDHA; además, los resultados de inhibición fueron tratados en porcentajes. Sería interesante continuar los estudios de estos compuestos y otros, para entender el comportamiento de dicha línea celular. Los autores no hacen comentarios al respecto de estos resultados y su posible causa. De igual manera, siempre es importante tener en cuenta que estudios *in vitro* siempre tienen la limitación de no reflejar las

mismas condiciones que ocurren *in vivo*. Por otro lado, también se observa que la inhibición no resultó ser concentración dependiente al aumentar la concentración de FX11 a 20  $\mu\text{M}$  la producción de lactato no disminuyó proporcionalmente.

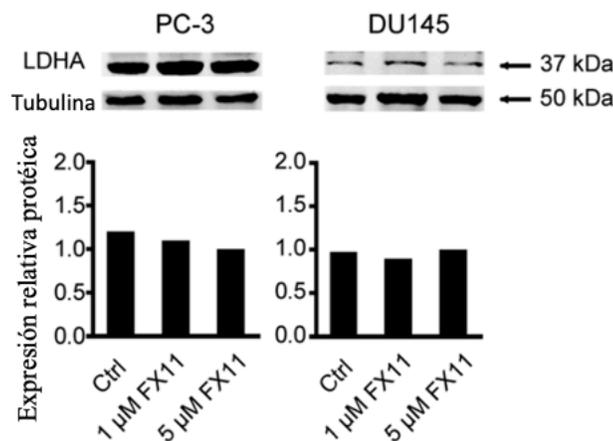


**Figura 20:** Inhibición de la producción de lactato debido a un tratamiento con FX11 (10 y 20  $\mu\text{M}$ ) vs, control (Rellinger et al., 2017).

\*  $P < 0.05$  para 10  $\mu\text{M}$  de FX11 vs control

‡  $P < 0.05$  para 20  $\mu\text{M}$  de FX11 vs control

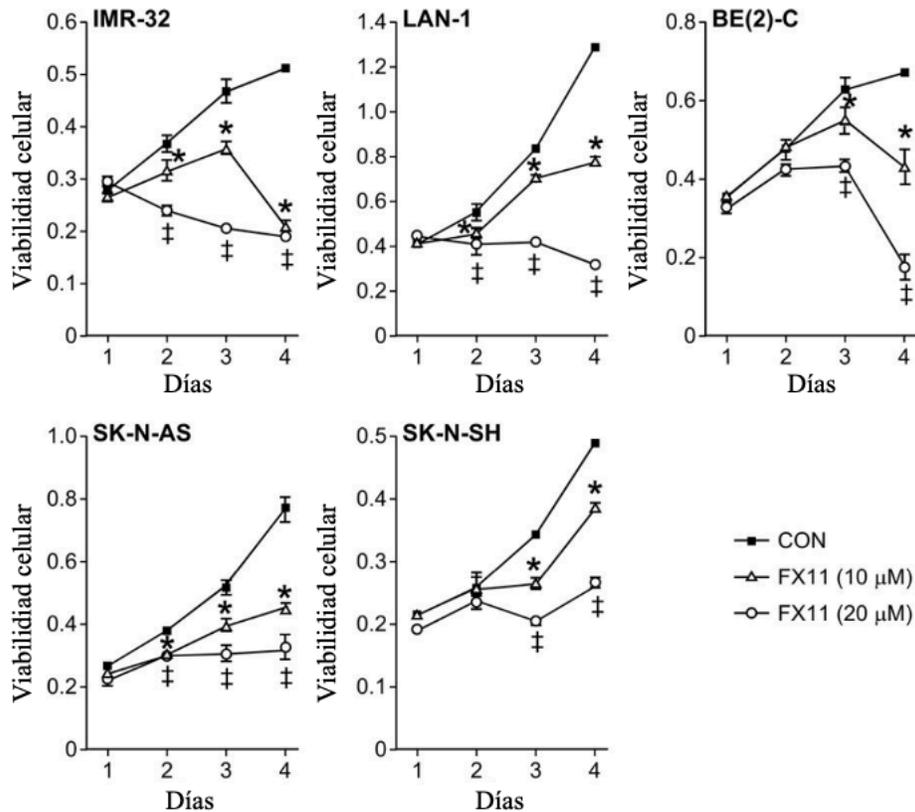
Este compuesto altera la actividad de la enzima LDHA mas no su expresión (Fig. 21), lo que induce una mejora en la glucólisis y por tanto un microambiente acidificado que ocasionan implicaciones en la fisiología del tumor. La tubulina se muestra como control (Xian et al., 2015).



**Figura 21:** Expresión protéica de la enzima LDHA en las líneas celulares PC-3 y DU145 (estándares para cáncer de próstata) después de un tratamiento con FX11 (Xian et al., 2015).

## Efectos antiproliferativos del FX11

Continuando con los resultados de Rellinger *et al.*, 2017, el FX11 tuvo efectos inhibitorios *in vitro* sobre la proliferación celular de cinco líneas celulares de neuroblastomas, después de una exposición con FX11 a 0, 10 y 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 22). En contraste con la producción de lactato, la concentración de 20  $\mu\text{M}$  tuvo efectos inhibitorios significativos sobre la proliferación, especialmente durante los días 3 y 4, y presentó un comportamiento concentración dependiente. Los autores atribuyen dichos resultados a efectos tóxicos sobre receptores *off-target* del FX11. Asimismo, un aumento en la fase G1 del ciclo celular (2-11%) y una disminución significativa en la fase S (2-7%) se encontró en todas las células evaluadas. Ello indica que el FX11 bloqueó la proliferación a través del ciclo celular (Rellinger *et al.*, 2017).



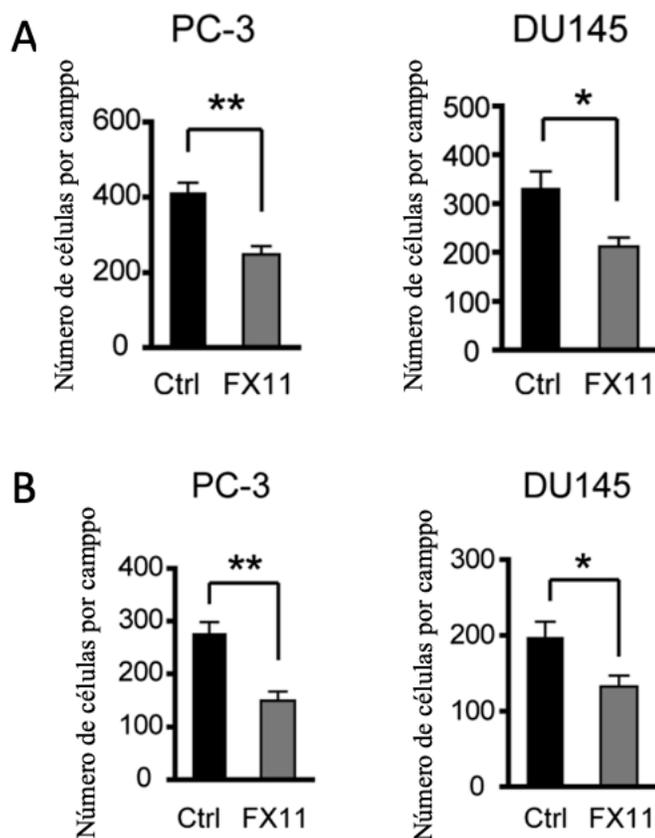
**Figura 22:** Inhibición del crecimiento celular de cinco líneas celulares de neuroblastoma, después de un tratamiento con 10 y 20  $\mu\text{M}$  de FX11 (Rellinger *et al.*, 2017).

\*  $P < 0.05$  para 10  $\mu\text{M}$  de FX11 vs control

‡  $P < 0.05$  para 20  $\mu\text{M}$  de FX11 vs control

## Efectos antimetastásicos del FX11

Existe un estudio en líneas celulares de cáncer de próstata que confirma la inhibición de migración e invasión celular después de un tratamiento con FX11 (Fig. 23) indicando que el decremento de la actividad de LDHA está involucrado en el efecto antitumoral de FX11 (Xian et al., 2015). La deficiencia de LDHA llevó a una disminución en la producción de lactato y por tanto menor migración e invasión. Sin embargo, debido a que estos autores no midieron la actividad de la enzima LDHA, no es posible confirmar si los efectos de FX11 fueron debidos a una disminución de la isoforma LDHA o por la molécula en sí. Después de los comentarios en la sección anterior es importante aclarar que no son efectos *off-target*. La diferencia entre el concepto de migración (gráficas superiores) y la invasión (gráficas inferiores) es que el primero habla sobre movimiento celular normal como respuesta a estímulos químicos o mecánicos y el segundo sobre la acción es-



**Figura 23:** Efectos sobre la migración (A) e invasión (B) celular de las líneas celulares PC-3 y DU145 (estándares de cáncer de próstata) después de un tratamiento con FX11 (Xian et al., 2015).

\* P < 0.05 ; \*\* P < 0.01

pecífica de invadir tejidos y la habilidad de volverse móviles atravesando la membrana extracelular. Independientemente, ambas líneas presentan efectos significativos y aunque para el caso de la PC-3 la  $p < 0.01$  y, tal vez el efecto es mayor, para los objetivos de este trabajo son similares los efectos y ambos se consideran igualmente ciertos.

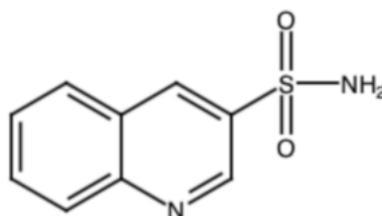
### **Limitaciones del FX11**

Independientemente de que el FX11 presenta resultados prometedores sobre la inhibición de la LDHA y ayuda para elucidar el efecto Warburg y sus consecuencias moleculares, el uso de éste presenta algunos retos terapéuticos. En un estudio para linfomas se calculó que la dosis para una eficacia *in vivo* debía ser de 42  $\mu\text{g}$  para inyección intraperitoneal de manera diaria con un nivel sérico inicial esperado de  $\sim 100$   $\mu\text{g}$  asumiendo una distribución uniforme e inmediata y sin considerar la vida media o metabolismo del fármaco. Aunque todas estas condiciones siendo asumidas fueran ciertas, lo cual es muy poco probable, la solubilidad de este compuesto interfiere y se convierte en un factor dosis limitante ya que sólo podría duplicarse la dosis antes de llegar al límite de la solubilidad de FX11 en solución acuosa (Le et al., 2010). En otras palabras, una vez más tenemos un compuesto que clínicamente no parece ser prometedor. Adicionalmente, algunos estudios han cuestionado la efectividad de FX11, ya que como fue mencionado anteriormente, es posible que algunos de los efectos observables no se atribuyan a la inhibición de la LDHA si no a la naturaleza reactiva del grupo catecol, por tanto, la molécula no sería un candidato adecuado, ya que ese grupo es altamente reactivo y su posterior desarrollo sería detenido (Feng et al., 2018). No tener un comportamiento dosis dependiente ocasiona que el desarrollo del medicamento y la búsqueda de una dosis clínicamente adecuada sea mucho más complicada de conseguir y conlleva más factores que no pueden ser controlados y por otra parte, tener efectos *off target* implica que puedan ocurrir efectos secundarios no deseados que pudieran ocasionar alteraciones fisiológicas más complicadas.

### 4.2.3 Quinolinas 3-sulfonamidas

#### Generalidades

Las quinolinas representan una de las clases de nitrogenados conteniendo heterocíclicos con gran significancia terapéutica (Syed, 2016). Entre sus derivados se encuentran las quinolinas 3-sulfonamidas (Fig. 24), las cuales son inhibidores de la enzima LDH al competir con el NADH, presentan una mayor selectividad hacia la isoforma LDHA que hacia la isoforma LDHB (Feng et al., 2018).



**Figura 24:** Estructura general de una quinolina 3-sulfonamida

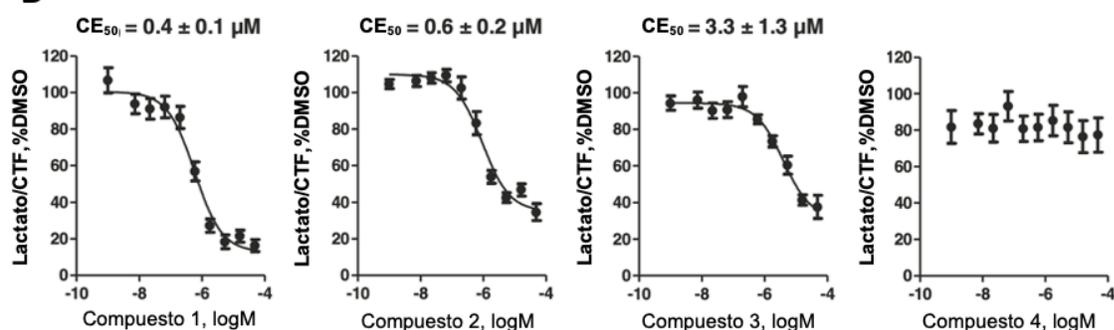
---

#### Inhibición de la LDH

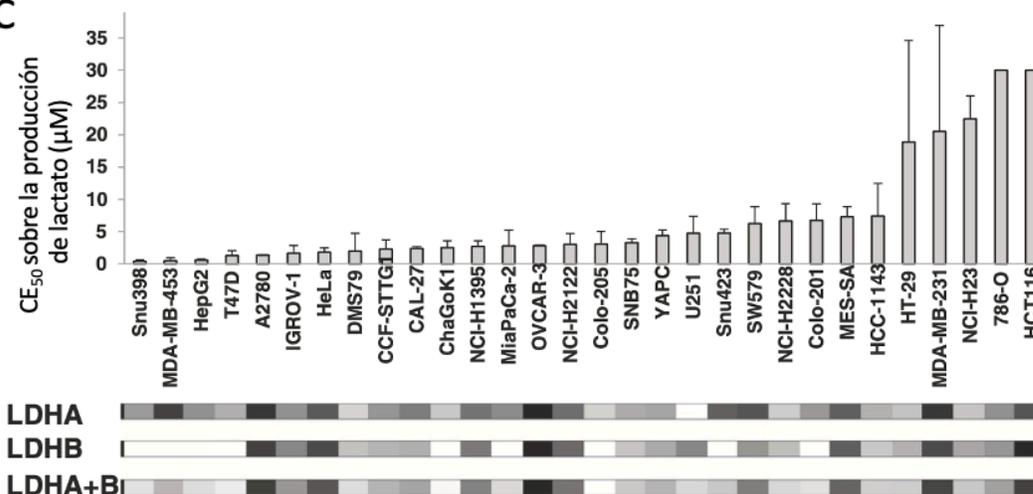
Durante esta sección se mencionan 3 compuestos identificados por Billiard et al. (2013) visualizados en la figura 25A. Dichos compuestos se obtuvieron utilizando la colección de la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) y seleccionando aquellos con  $CI_{50}$  de 2 a 3 nM. Posteriormente, una prueba sobre la actividad celular de dichos inhibidores se realizó en células de carcinoma hepatocelular humano (Snu398) conteniendo niveles indetectables de LDHB. Para ello se utilizaron concentraciones crecientes de los 4 compuestos. Los compuestos 1 a 3 mostraron inhibición sobre la producción de lactato, mientras que el análogo inactivo (compuesto 4) no ocasionó dicho efecto (Figura 25B). A pesar de que los inhibidores presentaron concentraciones inhibitorias de 2 a 16 nM, inhibieron al lactato celular con  $CE_{50}$ =400 a 600 nM. Los autores sospecharon que dicha atribución fue debida a baja permeabilidad celular. Tomando en cuenta lo anterior, se calcularon dichas concentraciones que resultaron ser altas. Billiard *et al.* aclararon que, aunque los compuestos entran a la célula, una alta permeabilidad celular no indica que existan altas concentraciones del compuesto en su forma libre (Billiard et al., 2013). Otra razón que podría explicar los valores de  $CE_{50}$ , es que exista una alta concentración de LDHA en las células de elección, por lo que realizaron este ensayo en diferentes líneas celulares (Fig. 25C).

Compuesto	1	2	3	4
Estructura				
hLDHA Cl <sub>50</sub>	0.0026 ± 0.0019 μM	0.016 ± 0.007 μM	0.080 ± 0.0022 μM	> 50 μM
hLDHB Cl <sub>50</sub>	0.043 ± 0.014 μM	0.22 ± 0.02 μM	0.055 ± 0.009 μM	> 50 μM

**B**



**C**

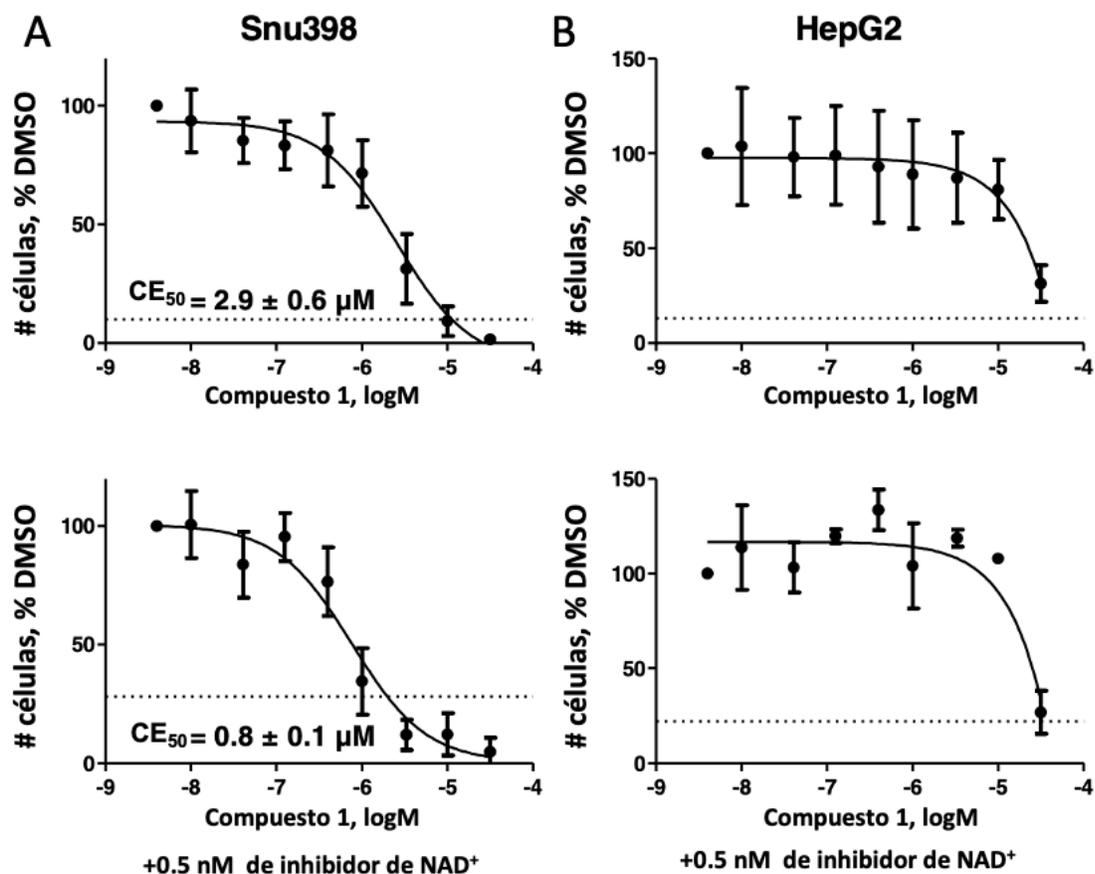


**Figura 25: Efecto de las quinolinas 3-sulfonamida sobre la LDHA y la producción de lactato en células cancerígenas.** (A) Estructuras de los inhibidores de la LDHA y su Cl<sub>50</sub> sobre enzimas LDH recombinantes humanas. (B) Inhibidores potenciales (1-3) inhiben la producción de lactato en células Snu398 de carcinoma heptaocelular, en comparación con el compuesto 4 que no tiene efecto sobre el lactato celular. La concentración de lactato fue normalizado a viabilidad celular a través del ensayo: CellTiterFluor (CTF); la relación lactato/CTF que se obtuvo en células tratadas con DMSO fue fijado a 100%. (C) Diferentes líneas celulares cancerígenas presentan sensibilidades diferentes hacia la inhibición de LDHA (Billiard et al., 2013)

Este estudio muestra ser muy interesante justamente por la figura 25C, de toda la información y resultados encontrados hasta ahora durante este trabajo, éste es el primero que amplía las líneas celulares estudiadas para comprender las diferentes sensibilidades y poder enfocarse en unos tipos de cánceres más que en otros. Aunque sería un poco ingenuo pensar que alguno de estos compuestos pudiera inhibir y causar los efectos deseados para cada uno de los cánceres existentes. Después de los ensayos realizados anteriormente es evidente que el compuesto 4 queda descartado, 1 y 2 presentan las menores  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$  y, para la figura 25C eligen el compuesto 1 como referencia donde las líneas celulares del lado izquierdo son más sensibles (hígado, ovario, mama) que las de la derecha (colon, riñón, pulmón) (Billiard et al., 2013).

### **Efectos antiproliferativos de las quinolinas 3-sulfonamidas**

Posteriormente, Billiard, *et al.* (2013) realizaron estudios con el objetivo de concentrarse en el compuesto 1, entre ellos, la inhibición sobre la proliferación de la línea celular Snu398 (carcinoma heptaocelular) y HepG2 (células hepáticas no cancerígenas). Donde se observó un comportamiento dosis dependiente para las Snu398 (Fig. 26A superior) al igual que la inducción de la apoptosis sobre dicha línea celular después de 24 h de incubación. Debido a que la síntesis de  $NAD^+$  es uno de los componentes esenciales para la función adecuada de LDH, los autores sugirieron reducir el abasto de  $NAD^+$  para potenciar los efectos de la inhibición de LDH sobre la sobrevivencia celular. Al añadir el inhibidor de  $NAD^+$ : NAMPT, la potencia del compuesto 1 incrementó ocasionando una dosis suficiente como para inducir muerte celular (Fig. 26A inferior). Por el otro lado, para la línea celular HepG2, el compuesto 1 no ocasionó cambios en la sobrevivencia excepto en la dosis más alta (Fig. 26B superior), la adición del inhibidor NAMPT no mejoró la potencia del compuesto 1 (Fig. 26B inferior), (Billiard et al., 2013). Esto quiere decir que para células hepáticas, el compuesto 1 logra inhibir el crecimiento de células tumorales mas no de las no tumorales, lo cual es deseable para no interrumpir el funcionamiento hepático normal del paciente.

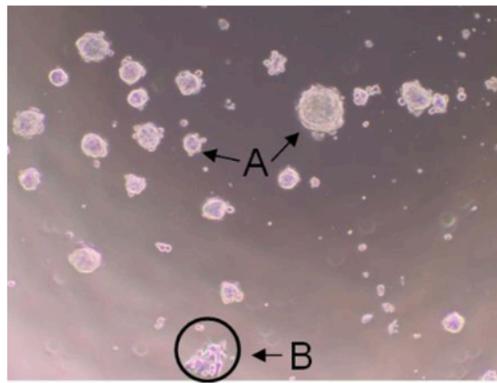


**Figura 26: Inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis en Snu398, mas no HepG2.** (A,B) Ambas líneas celulares fueron tratadas con DMSO o dosis crecientes del compuesto 1 de 4 a 8 días; posteriormente se realizó un ensayo de viabilidad celular. Las gráficas inferiores fueron obtenidas al añadir la presencia de un inhibidor de la síntesis de NAD<sup>+</sup> (NAMPT). La línea punteada indica la densidad inicial de células (Billiard et al., 2013).

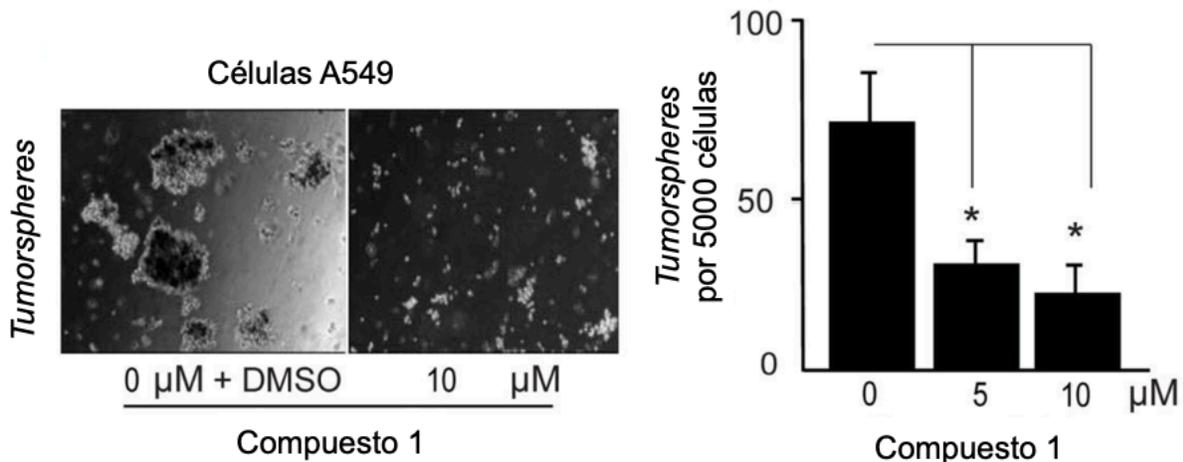
### Efectos antimetastásicos de las quinolinas 3-sulfonamidas

Aunque no se encontraron estudios que evalúan específicamente el efecto de este tipo de quinolinas sobre la invasión o metástasis, un estudio evaluando el efecto sobre *tumorspheres* fue reportado. Un *tumorsphere*, es una formación esférica sólida que se desarrolla a partir de una célula cancerígena progenitora, la diferencia entre una agregación celular (Fig. 27A) y este tipo de formaciones (Fig. 27B) es que, en agregaciones celulares las células individuales son fácilmente identificables y en *tumorspheres*, no, visualmente parece haber una fusión entre células (Johnson, Chen & Lo, 2013). Adicionalmente, algunos autores han discutido la presencia de *tumorspheres*

en la sangre como marcador de metástasis específicamente en pacientes con cáncer de mama (Pizon, Schott, Pachmann & Pachmann, 2016), por lo que son relevantes los siguientes resultados. Considerando esto, Xie *et al.* (2014) encontraron que la inhibición de LDHA causada por el compuesto 1 de GSK redujo la habilidad de la línea celular A549 (carcinoma pulmonar) para formar *tumorspheres* (Fig. 28). Aunque la imagen del lado izquierdo sea oscura se logra observar la diferencia fisiológica entre células sin el compuesto 1 y con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto 1 y, del lado izquierdo se observa un comportamiento concentración dependiente y significativo entre la concentración del inhibidor y la formación de *tumorspheres*. Aunque este ensayo sea *in vitro* y se asuma que esto tiene un valor antimetastásico, es evidente que la inhibición de la LDHA por parte de este compuesto tiene un efecto sobre la progresión tumoral.



**Figura 27:** Diferencia estructural entre un *tumorsphere* (A) y una agregación celular (B), (Johnson, Chen & Lo, 2013).



**Figura 28:** Inhibición sobre la formación de *tumorspheres* al utilizar 0, 5 y 10  $\mu\text{M}$  del compuesto 1 de GSK, (Xie *et al.*, 2014). \* $P < 0.05$

### **Limitaciones de las quinolinas 3- sulfonamidas**

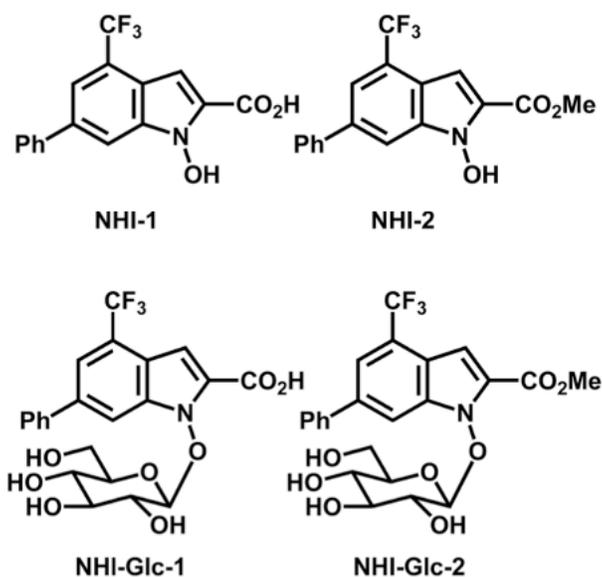
Farmacocinéticamente, la depuración del compuesto 1 después de una infusión intravenosa de 0.25 mg/kg en ratas mostró ser de 69 mL/min/kg, lo cual excede el flujo hepático normal de las ratas ( $\approx$  55 mL/min/kg). Por el otro lado, la administración oral de 100 mg/kg en ratones resultó en niveles sanguíneos del compuesto por debajo del límite de detección (2.5 ng/mL). Considerando todo lo anterior, no se continuaron estudios animales adicionales, las propiedades farmacocinéticas son inaceptables para el uso *in vivo*. Otra limitación de los compuestos propuestos por GSK es el hecho de que a dosis iguales o mayores a 10  $\mu$ M se manifiestan efectos directos mitocondriales que posiblemente no son mediados por la inhibición de la LDH. Sin embargo, los estudios sobre estos compuestos continúan contribuyendo a la elucidación de aspectos clave de la biología de la enzima lactato deshidrogenasa y las consecuencias de su inhibición (Billiard et al., 2013). Aunque este estudio no sea tan reciente, aporta todo lo mencionado anteriormente y siempre pudiera existir la posibilidad de que debido a que estos compuestos vienen de una farmacéutica exista información oculta debido a asuntos de patentes, aún así se consideró relevante para este trabajo.

## 4.3 Compuestos cuyo mecanismo de acción es competir con el piruvato y el NADH

### 4.3.1 NHI

#### Generalidades

Los N-hidroxiindoles (NHI) son inhibidores atractivos ya que son sencillos de sintetizar y presentan toxicidad selectiva hacia células cancerosas y eficacia *in vitro* para cultivo celular. Cuando fueron evaluados los compuestos NHI-1 y NHI-2 se observó que pueden inhibir tanto LDHA como LDHB, así como los sitios del piruvato como del NADH. Debido a que las  $CI_{50}$  para la inhibición de LDHB son de aproximadamente 5 veces más grandes que para LDHA, los autores han decidido enfocarse en la inhibición de la última (Granchi et al., 2013). Esta clase de compuestos presentan el concepto de inhibir el efecto Warburg con una diana-dual al enlazar glucosa a un inhibidor enzimático glucolítico (Calvaresi et al., 2013), las estructuras ejemplo de todo lo anterior se presentan en la figura 29, esta diana adicional tiene como objetivo reducir la producción de lactato aún más (D'Andrea et al., 2019).

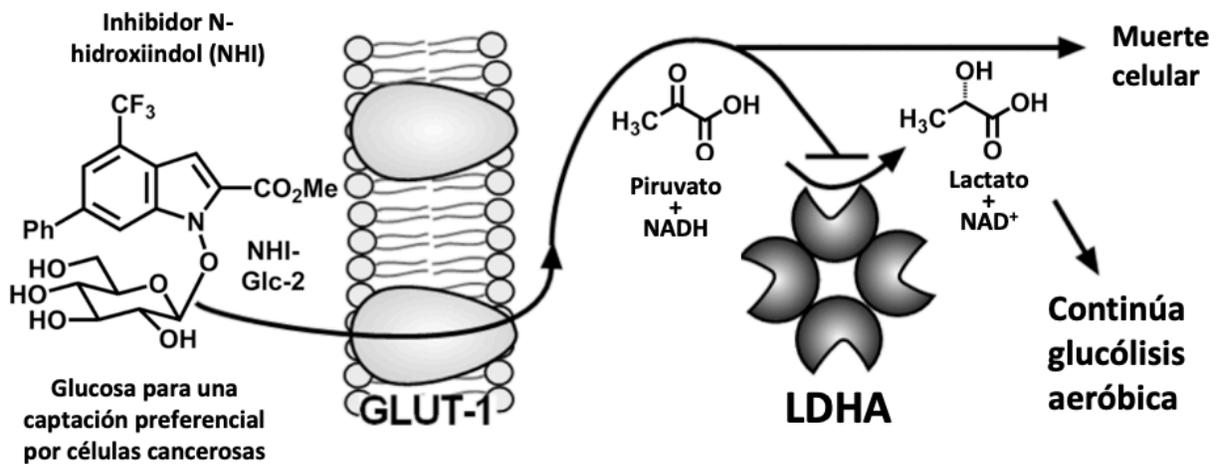


**Figura 29:** Estructuras de N-hidroxiindol (NHI) sin conjugar y conjugadas con glucosa (Calvaresi et al., 2013).

---

## Inhibición de la LDH

El enfoque específico que se le otorga al efecto Warburg, al estudiar a los NHI se basa en que la mayoría de las células tumorales muestran una sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT-1, además de la enzima de la glucólisis: LDHA, esto ya fue evaluado para el caso del oxamato. Utilizar los compuestos NHI más sus conjugados con glucosa logra afectar tanto la captación preferencial de glucosa como el aumento del proceso de la glucólisis en células cancerosas (Fig. 30). Además, minimiza los efectos *off target* ya que los conjugados mejoran la especificidad de los inhibidores de la LDHA (D'Andrea et al., 2019).



**Figura 30:** Diana-dual sobre el efecto Warburg al utilizar un inhibidor de LDHA conjugado con glucosa (Calvaresi et al., 2013).

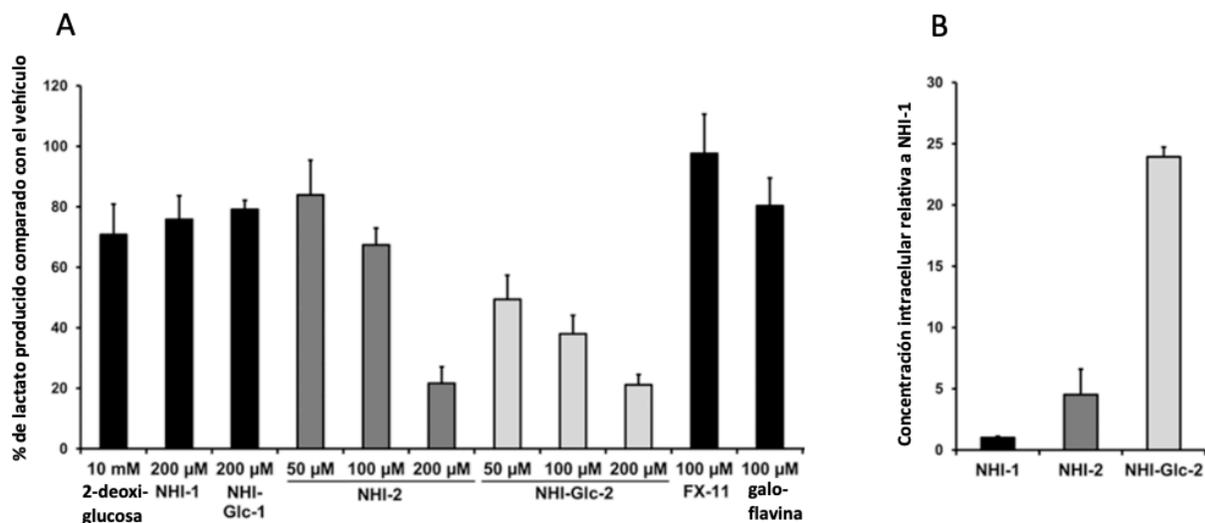
Tomando en cuenta lo anterior, algunos autores evaluaron la capacidad inhibitoria de estos 4 compuestos versus una serie de líneas celulares cancerígenas que representan a los tipos de cáncer en los que es común tener una sobreexpresión de la enzima LDHA. Éstos expresan niveles altos de GLUT-1, el NHI-Glc-1 no se encuentra en la tabla 3 ya que presentó una  $\text{CI}_{50} > 200 \mu\text{M}$  en células HeLa y por tanto se consideró como inactivo (Calvaresi et al., 2013). En la tabla 3 se encuentran ordenados, de izquierda a derecha, de mayor toxicidad a menor toxicidad, siendo el NHI-Glc-2 el más prometedor debido a sus concentraciones inhibitorias; sin embargo, no debe dejar de enfatizarse que para el fibroblasto no cancerígeno la concentración también es baja y eso podría causar efectos no deseados.

**Tabla 3:** Toxicidad celular cancerígena inhibidores de LDHA: NHI (Calvaresi et al., 2013).

Línea celular cancerígena	Tejido de origen	CI <sub>50</sub> (μM)		
		NHI-1	NHI-2	NHI-Glc-2
HeLa	Cervix	43.8 ± 4.6	33.4 ± 1.0	7.2 ± 0.2
A549	Pulmón	131.0 ± 17.6	44.1 ± 6.2	17.2 ± 3.0
H1299	Pulmón	141.0 ± 11.1	61.1 ± 11.8	18.0 ± 1.5
H226	Pulmón	120.7 ± 7.8	43.4 ± 5.3	16.8 ± 2.8
MCF-7	Mama	124.3 ± 7.1	64.9 ± 13.1	16.7 ± 1.1
BT549	Mama	110.1 ± 9.5	34.5 ± 10.0	12.7 ± 0.4
IGROV-1	Ovario	123.3 ± 6.8	57.4 ± 7.3	15.5 ± 3.0
WT-MEF	Fibroblasto normal	245.0 ± 13.0	80.5 ± 8.2	32.2 ± 0.2

Ahora bien, para poder evaluar la eficacia al inhibir la producción de lactato se trataron células HeLa con concentraciones variables de NHIs y otros inhibidores como es el caso de FX11, que ya fue discutido en este trabajo, y con galoflavina, que será mencionada posteriormente (Fig. 31A), (Calvaresi et al., 2013). Siendo consistente con los resultados de la tabla 3, NHI-Glc-1 sólo presenta efectos modestos a 200 μM y NHI-1 requiere de 500 μM. Por el otro lado, NHI-Glc-2 es más potente que NHI-2, muestra un comportamiento concentración dependiente en la reducción sobre la producción de lactato y muestra efectos modestos a concentraciones altas, lo cual no es el caso para FX11 o la galoflavina. Aunque el NHI-2 también presenta un comportamiento concentración dependiente, la relación entre la producción de lactato entre las concentraciones de 100 y 200 μM parece ser menos proporcional que para el caso del NHI-Glc-2.

De manera adicional, evaluaron la habilidad de estos compuestos para penetrar las células de A549. NHI-2 mostró estar presente con concentraciones 4.5 veces más altas que NHI-1 y, NHI-Glc-2 24 veces más concentrado (Figura 31B), lo cual demuestra que la estrategia utilizada funciona y ocasiona que exista una mayor disponibilidad intracelular.

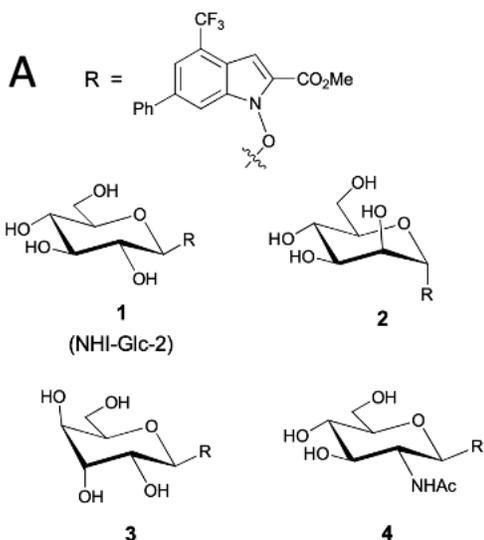


**Figura 31: Inhibición de la LDHA por NHIs. (A)** Inhibición sobre la producción de lactato al utilizar diferentes concentraciones de NHIs y otros compuestos conocidos (FX11 y galoflavina). **(B)** Concentración intracelular de NHI-1, NHI-2 y NHI-Glc-2 (Calvaresi et al., 2013).

### Efectos antiproliferativos del NHI

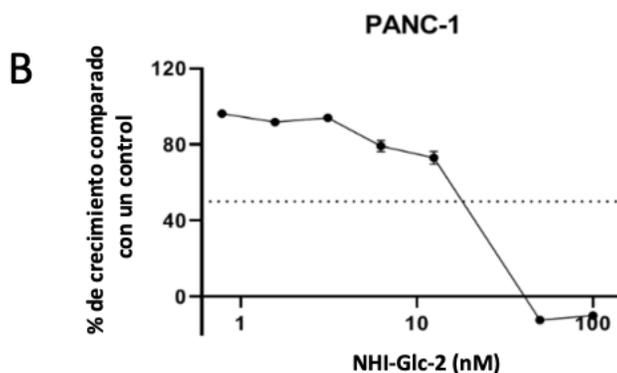
Tomando en cuenta todos los resultados anteriores, años después, se dieron a conocer resultados sobre los efectos antiproliferativos del NHI-Glc-2, ya que mostró ser el que tiene más potencial por sus menores  $CI_{50}$  y mayor concentración intracelular (Di Bussolo et al., 2015). En esta ocasión, observaron el efecto de utilizar otros azúcares que no fueran D-glucosa, ya que el transportador GLUT-1 puede transportar otros sustratos además de glucosa (Fig. 32A). Después de confirmar que los compuestos 2 y 3 logran penetrar a las células e inhiben la producción de lactato, se evaluó la capacidad antiproliferativa sobre las líneas celulares: HeLa y A549 (Tabla 4). El compuesto 1, ya conocido anteriormente como NHI-Glc-2, vuelve a presentar una mayor potencia que su aglicona NHI-2; el compuesto 2 conteniendo manosa resulta ser más potente que la aglicona, y el compuesto 3 conteniendo glucosa tiene menores concentraciones que la aglicona pero un poco mayores que el modelo NHI-Glc-2.

Posteriormente, diferentes autores evaluaron únicamente el efecto de NHI-Glc-2 (1) sobre la línea celular pancreática PANC-1, donde se observó que éste es capaz de inhibir la proliferación celular en rangos micro molares e incluso a concentraciones muy altas el número de células es menor al inicial (Fig. 32B), (Hassouni et al., 2020).



**Tabla 4:** Efecto antiproliferativo de los conjugados 1-3 (Di Bussolo et al., 2015).

Compuesto	CI <sub>50</sub> (μM)	
	HeLa	A549
NHI-2	33.4 ± 1.0	44.1 ± 6.2
1	7.2 ± 0.2	17.2 ± 3.0
2	5.4 ± 1.3	15.2 ± 0.7
3	11.8 ± 0.1	24.7 ± 0.9

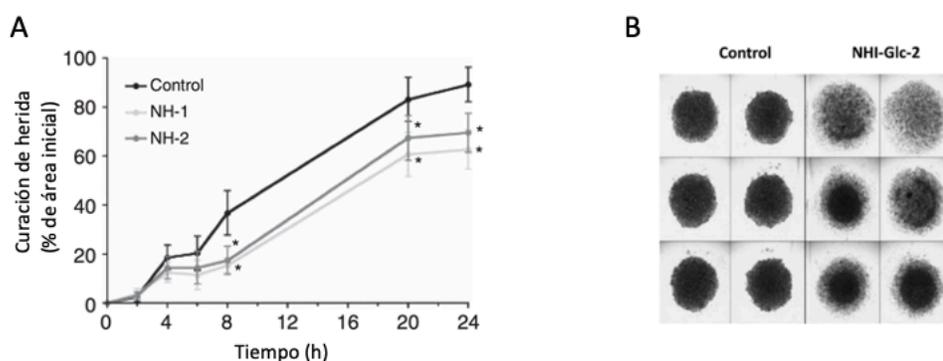


**Figura 32:** (A) Estructuras de NHI conjugados: β-D-Glc- (1), α-D-Man-(2), β-D-Gul- (3), y β-D-Glc(Nac)- (4); (Di Bussolo, et al., 2015). (B) Inhibición de la proliferación celular de la línea celular PANC-1 (Hassouni et al., 2020).

### Efectos antimetastásicos del NHI

En un estudio donde únicamente se evaluaron NHI-1 y NHI-2 se realizó un ensayo de curación de herida para evaluar la capacidad de inhibir la migración de células LPC006 (cáncer pancreático) (Maftouh et al., 2014). Para ello se administró 1 μM de NHI-1 o NHI-2 y, después de 8 h se observó una reducción significativa (Fig. 26 A) de aproximadamente 20% en comparación con el control. Sorprendentemente, en contraste con todos los resultados obtenidos hasta ahora el compuesto NHI-1 mostró tener un efecto antimetastásico superior al del NHI-2, evidentemente sería ideal incluir al NHI-Glc-2 para evaluar el comportamiento observado hasta este momento, pero no se encontró información similar incluyendo a todos los compuestos evaluados hasta el momento.

Por el otro lado, continuando con la serie de artículos anteriores de Hassouni *et al.*(2020), se realizó un ensayo visual donde se observaron los cúmulos ya mencionados en el compuesto anterior: *tumorspheres*, de la línea celular PANC-1 al ser expuestas a un tratamiento de 1  $\mu$ M de NHI-Glc-2 cada 3 días, durante un total de 12 días de observación (Fig. 33B), (Hassouni et al., 2020). Aunque la visualización de dichos *tumorspheres* es distinta al ensayo mencionado anteriormente, es clara que la integridad de dichas estructuras se ve deteriorada después de adicionar el compuesto en cuestión, debido a que estas estructuras han sido consideradas como marcadores de metástasis se consideran a estos resultados cualitativos como efectos antimetastásicos.



**Figura 33:** Actividad antimetastásica de NHI's. **(A)** Ensayo de curación de herida en células LPC006 después de ser expuestas a 1  $\mu$ M de NHI-1 o NHI-2. \* $P > 0.05$  (Maftouh, et al., 2014). **(B)** Deterioro de la integridad de *tumorspheres* de células PANC-1 (Hassouni et al., 2020).

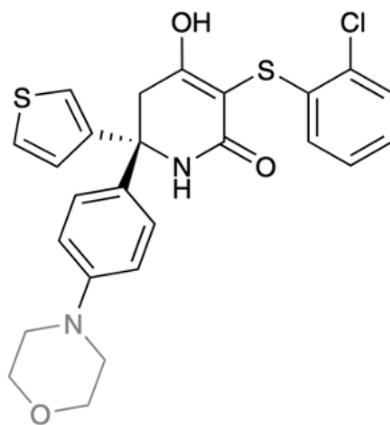
### Limitaciones del NHI

Aunque este compuesto parece ser muy prometedor ya que los tres parámetros evaluados para cada compuesto o grupo de compuestos en este trabajo mostraron resultados deseados, es posible que para poder avanzar a nivel clínico no pueda administrarse como monoterapia ya que las células que utilizan este tipo de metabolismo es una subpoblación. La información disponible acerca de este compuesto a nivel clínico indica que en 2014 (Maftouh, et al., 2014) la fase preclínica fue detenida debido a que existía poca evidencia acerca del mecanismo y sus efectos. Como es evidente en esta sección, el día de hoy existe más evidencia por lo que sería prudente evaluar parámetros de toxicidad a nivel *in vivo* para poder considerar la posibilidad de avanzar de manera clínica

#### 4.3.2 GNE-140

##### Generalidades

Después de haber realizado una búsqueda extensiva de moléculas pequeñas en una biblioteca digital, algunos autores sugirieron realizar modificaciones de un compuesto inicial para obtener uno que ocupara tanto el sitio activo del piruvato como del NADH. El nombre de dicho compuesto es: GNE-140 (Fig. 34) y es conocido por inhibir a las isoformas: LDHA, LDHB y LDHC (Boudreau et al., 2016).

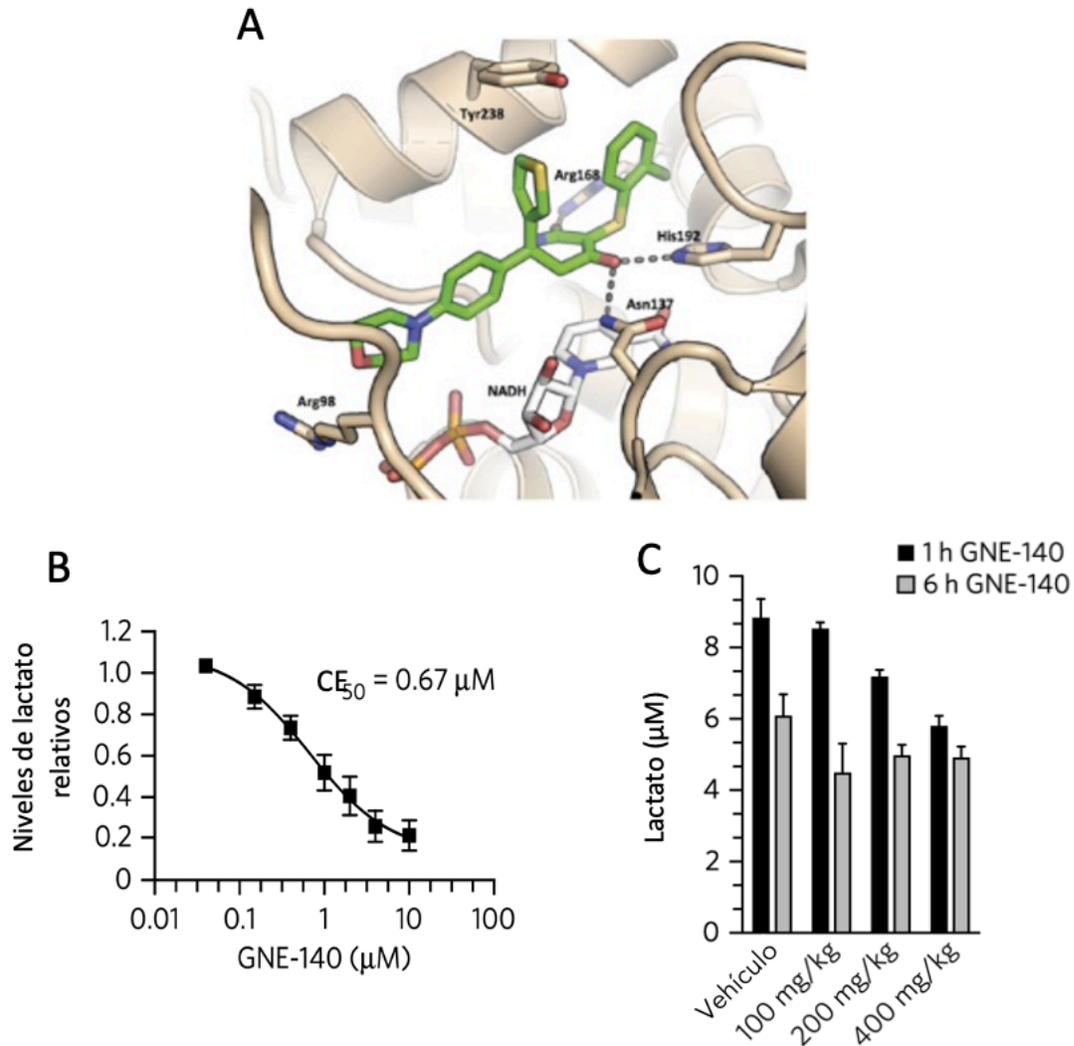


**Figura 34:** Estructura del GNE-140

---

##### Inhibición de la LDH

Boudreau *et al.* (2016) realizaron un estudio con el GNE-140 en la línea celular pancreática: MIA PaCa-2, en donde los valores de  $CI_{50}$  para LDHA y LDHB fueron  $0.003 \mu\text{M}$  y  $0.005 \mu\text{M}$ , respectivamente, aunque son resultados *in vitro* se tiene una concentración clínicamente más atractiva. El GNE-140 se une a la LDHA en el sitio activo adyacente al NADH formando puentes de hidrógeno con los aminoácidos Arg168, His192 o Asn137 del sitio activo (Fig. 35A). También, resultados indican que después de 6 h de exposición al GNE-140 los niveles de lactato se redujeron indicando que la inhibición fue exitosa (Fig. 35B). Para observar los efectos de la inhibición de la LDHA se midieron los niveles de otros metabolitos de la glucólisis y ciclo de las pentosas, éstos incrementaron después de ser expuestos a GNE-140. En otras palabras, así como el decremento de niveles de lactato indica que existe una inhibición, el aumento de todos los demás metabolitos anteriores indica que efectivamente la enzima siendo inhibida es la LDHA y que este efecto/disminución de lactato no está ocurriendo en otra parte de la ruta metabólica. Por otro la-



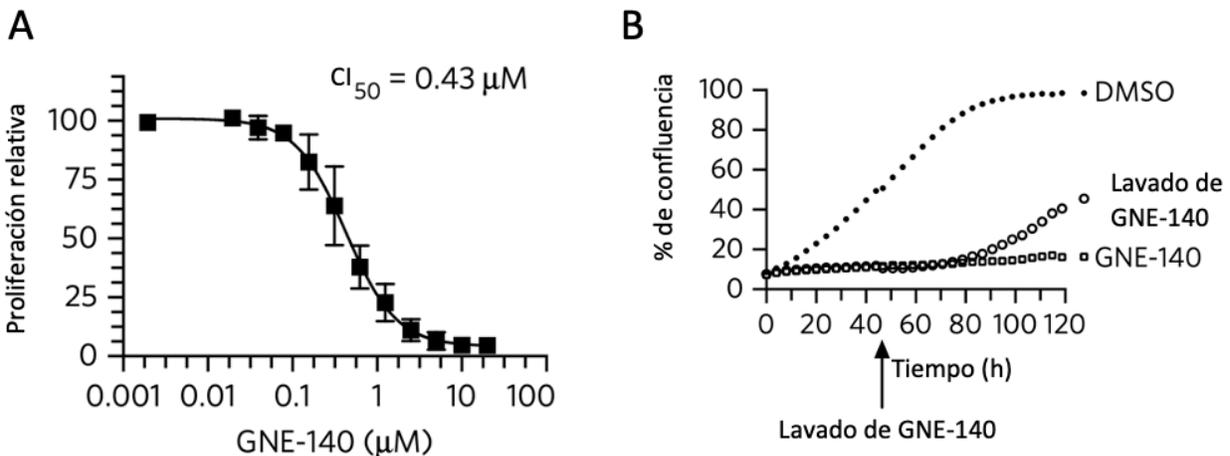
**Figura 35: Inhibición de la LDHA por parte del GNE-140.** (A) Estructura de un GNE-140 (verde) y NADH adyacente (blanco) situados en el sitio activo de la LDHA. Los puentes de hidrógeno están señalados con líneas punteadas. (B) Reducción de los niveles de lactato determinados en células MIA-PaCa-2 expuestas a GNE-140 durante 6 horas. (C) Reducción de los niveles de lactato *in vivo* después de administrar 2 dosis diarias de 100, 200 o 400 mg/kg durante 7 d (Boudreau et al., 2016).

do, los autores realizaron un análisis de la inhibición de la LDHA *in vivo* en el cual utilizaron ratones que presentaban tumores en células MIA-PaCa-2 y éstos fueron administrados con 2 dosis diarias de 100, 200 y 400 mg/kg durante 7 días. Después de cosechar los tumores se observó una reducción de lactato con comportamiento dosis dependiente (Fig.35C). Sin embargo, después de 6 h no se detectaron cambios significativos, indicando que el GNE-140 presenta una rápida

depuración y por tanto esto reduce su eficacia (Boudreau et al., 2016). Aunque se demuestra que el GNE-140 logra inhibir a la enzima LDHA tanto *in vitro* como *in vivo* y que para ambos es dosis dependiente, la rápida depuración pudiera causar complicaciones a la hora de conseguir la dosis y el tiempo entre administraciones adecuado para el uso clínico de este compuesto.

### Efectos antiproliferativos del GNE-140

Continuando con el experimento anterior, el GNE-140 mostró un efecto antiproliferativo con una  $CI_{50} = 0.43 \mu\text{M}$  (Fig. 36A). Este efecto fue asociado con un incremento en los niveles de la caspasa activa-3, pero al evaluar la muerte celular resultante se observó que al eliminar el compuesto después de 2 días de exposición las células volvieron a proliferar (Fig. 36B), por lo que es necesario inhibir a la LDHA por más de 2 días (Boudreau et al., 2016). La caspasa activa-3 es conocida por ser un mediador y marcador de apoptosis por lo que el incremento de esta proteasa indica que el efecto antiproliferativo que está sucediendo ocurre debido a la activación de esta muerte celular programada. Una vez más, la rápida depuración de este compuesto ocasiona que su uso clínico sea evaluado con más detenimiento.



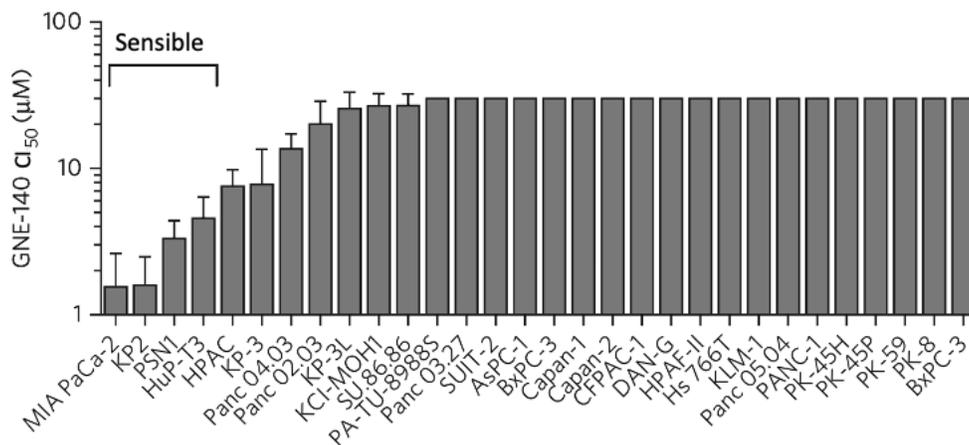
**Figura 36: Efectos antiproliferativos del GNE-140. (A)** Proliferación relativa de células MIA PaCa-2 expuestas a GNE-140. **(B)** Crecimiento celular determinado por imágenes de células vivas de MIA PaCa-2. Las células se incubaron con  $2 \mu\text{M}$  de GNE-140 de manera continua o con un lavado a los 2 días (Boudreau et al., 2016).

## Efectos antimetastásicos del GNE-140

Por el momento no existe información o resultados enfocados en esta actividad en particular pero con la información recabada hasta el momento podría suponerse que al igual que todos los otros compuestos, la inhibición de la LDHA termina causando un efecto antimetastásico. Aún así, es necesario continuar dicha investigación.

## Limitaciones del GNE-140

Para comprender mejor los efectos del GNE-140, los autores realizaron un ensayo de resistencia en 30 líneas pancreáticas diferentes, de las cuales 4 fueron identificadas como sensibles y mostraron  $CI_{50} < 5 \mu M$  (Fig. 37). Los autores enfatizan que las líneas más sensibles fueron aquellas que dependen más de la glucólisis y aquellas resistentes dependen de la fosforilación oxidativa, por lo que sugieren inhibir ambas vías (Boudreau et al., 2016). Adicionalmente a esto, una gran limitación que fue expuesta anteriormente es que, si se elimina el compuesto después de 2 días, las células vuelven a proliferar, lo que indica que se requiere de una inhibición sostenida a largo plazo para poder causar muerte celular. En otras palabras, el GNE-140 requiere propiedades farmacocinéticas que permitan esta inhibición *in vivo*. Los autores sugieren del acompañamiento de agentes que tienen como diana a la mitocondria, pero hace falta continuar con dichos estudios.



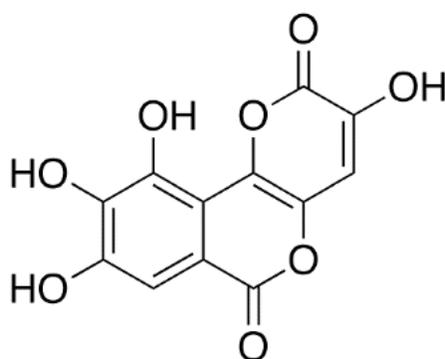
**Figura 37:**  $CI_{50}$  de 30 líneas celulares pancreáticas sensibles y resistentes a GNE-140. Se realizó un ensayo de proliferación durante 3 d (Boudreau et al., 2016).

## 4.4 Compuestos cuyo mecanismo de acción es unirse a LDH libre

### 4.4.1 Galoflavina

#### Generalidades

La galoflavina (Fig. 38) es un compuesto sintético que se obtiene a través de la oxidación de una solución alcalina de ácido gálico. Tiene buena permeabilidad celular y aunque inhibe tanto a la LDHA como a la LDHB, su identificación fue enfocada en la isoforma A (Manerba et al., 2012). Dicha inhibición ocurre al unirse a la forma libre de la enzima, es decir, no compite con los sustratos o cofactores (Feng et al., 2018).



**Figura 38:** Estructura de la galoflavina

-----

#### Inhibición de la LDH

La identificación de este compuesto fue a través de rastreos virtuales de catálogos (*virtual screening*), en donde se fueron seleccionando y filtrando diferentes compuestos, como resultado final se eligió a la galoflavina. Las concentraciones mínimas para la inhibición total se calcularon para las dos isoformas de la LDH ( $CI_{100}$ ) y a partir de estas concentraciones se evaluaron efectos sobre la producción de lactato, niveles de ATP y proliferación celular. Para poder comparar los resultados obtenidos se utilizaron las características del oxamato, ya que es el compuesto inhibitorio de la LDH más conocido, lo anterior se encuentra reflejado en la Tabla 4 (Manerba et al., 2012). Aunque es menos común utilizar el parámetro  $CI_{100}$  en vez de  $CI_{50}$ , la primera fue utilizada para poder identificar si los compuestos logran ser inhibidores totales y no para conocer la concentración ideal. Considerando lo anterior, la galoflavina requiere de una menor concentración para inhibir de manera total tanto a la isoforma A como la B. Es importante recalcar,

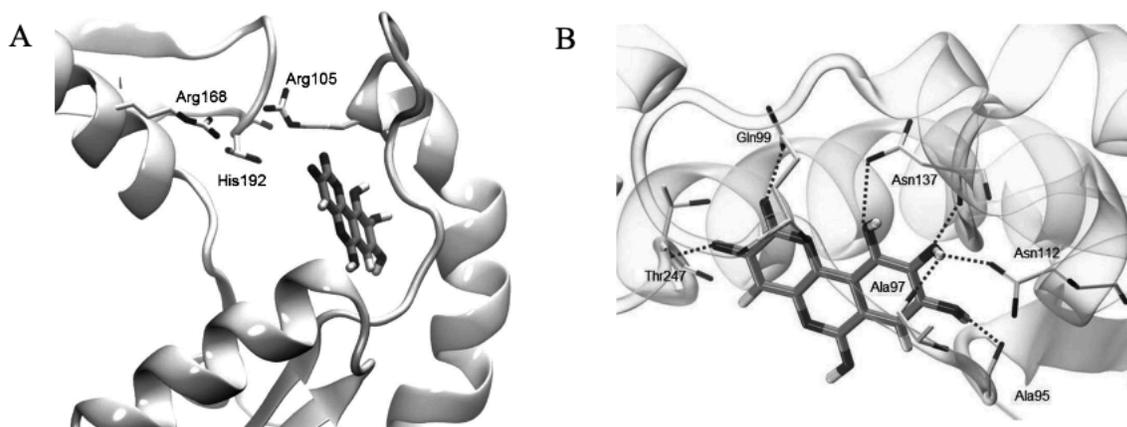
aunque indicado en la tabla, que los efectos mostrados para el oxamato se encuentran a concentraciones tan altas como  $4 \times 10^4 \mu\text{M}$  debido a la limitada permeabilidad ya analizada en este trabajo. Para la galoflavina se observó una buena relación entre la disminución de los niveles de lactato y la disminución de ATP celular. También, la galoflavina inhibió el crecimiento celular y no afectó la respiración, es decir el funcionamiento de la mitocondria que pudiera ocasionar efectos tóxicos no deseados.

**Tabla 4: Efectos biológicos de inhibidores de la LDH (Manerba et al., 2012).**

Compuesto	CI <sub>100</sub> (μM)		Producción de lactato	Inhibición (%)		Respiración
	hLDH-A	hLDH-B		Niveles de ATP	Crecimiento celular	
Galoflavina	201	200	44.0 ± 4.1	34.2 ± 5.2	61.8 ± 5.0	0.89 ± 6.7
Oxamato *	690	1175	67 ± 2.9	28.7 ± 2.4	34.5 ± 0.5	5.71 ± 2.5

\* Los datos mostrados para el oxamato son efectos observados a  $4 \times 10^4 \mu\text{M}$

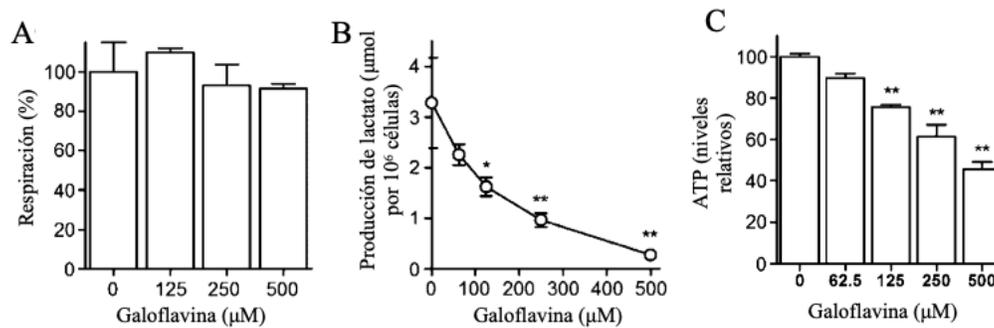
En las figuras 39A y 39B se puede observar la posición del *docking* de la galoflavina con la LDH-A. Dicha interacción ocurre debido a la formación de puentes de hidrógeno, particularmente entre



**Figura 39: Enlace LDHA- galoflavina. A.** Posición calculada después de *virtual screening*, los residuos Arg 168, Arg 105 e His 192 se consideran catalíticamente relevantes. **B.** Sitio de unión de la galoflavina con la LDH-A humana; los átomos involucrados en la formación de enlaces de hidrógeno están representados por líneas punteadas (Manerba et al., 2012).

el oxígeno del grupo carbonilo de la galoflavina y la Thr247 Y Gln99 de la enzima y, los grupos hidroxilo establecen dichos puentes con los aminoácidos Asn 137 y Ala95. El *docking* con la isoforma LDHB es muy similar a la mostrada en la figura superior (Manerba et al., 2012).

De manera experimental, los autores trataron células de carcinoma hepático (PLC/PRF/5) con diferentes concentraciones de galoflavina (Fig. 40). Una vez más, poca afectación se observó sobre la respiración celular independientemente de la concentración utilizada, indicando una falta de toxicidad hacia funciones mitocondriales. El resto de los parámetros (producción de lactato y síntesis de ATP) mostraron efectos dosis dependiente. La concentración necesaria para ocasionar una disminución del 50% de lactato (CI<sub>50</sub>) es de 140 μM de galoflavina, que, aunque es menor a la del oxamato, es mayor a la presentada por algunos compuestos durante este trabajo.



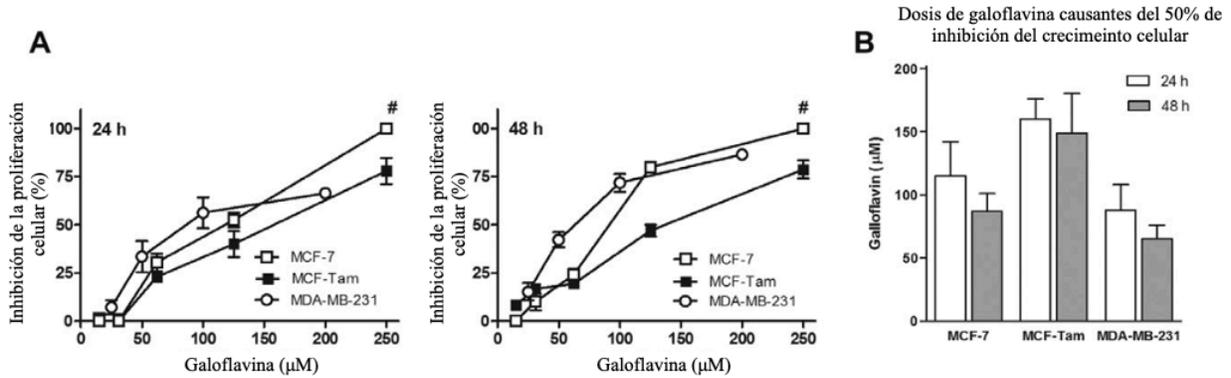
**Figura 40: Efectos biológicos de la galoflavina. A.** Respiración celular, **B.** inhibición de la producción de lactato, **C.** Niveles disminuidos de ATP. Control y disolvente: DMSO. (Manerba et al., 2012).

\* P < 0.05; \*\*P < 0.01

### Efectos antiproliferativos de la galoflavina

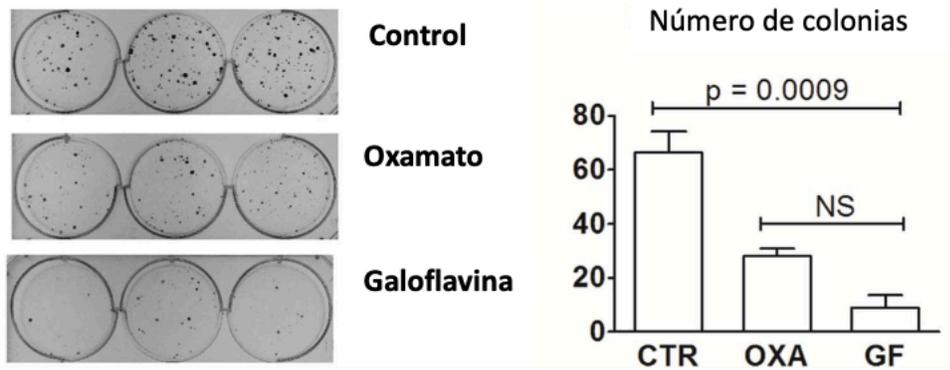
En los datos mostrados en la tabla 4 se muestran datos indicando efectos antiproliferativos de la galoflavina; adicionalmente, otros autores (Farabegoli et al., 2012) evaluaron la actividad antiproliferativa de este compuesto en células de cáncer de mama (MCF-7, MCF-Tam, MDA-MB-231) y obtuvieron resultados a las 24 y 48h (Fig. 40) mostrando la inhibición del crecimiento celular y también en el número celular para la dosis más alta (250 μM). Como lo indica la figura 41, no existe una diferencia significativa entre líneas celulares, por lo que se puede estipular que la galoflavina tiene efectos antiproliferativos para las tres, al inhibir la LDH. Además, el símbolo # indica que existen menos células que las que hubo en un principio y por eso el porcentaje de

inhibición se encuentra en la marca del 100; esto indica que una vez más el efecto antiproliferativo seguramente también incrementó la apoptosis. De acuerdo con la figura 40B, la  $CI_{50}$  calculada para las tres líneas celulares es de 90-150  $\mu$ M.



**Figura 41: Inhibición de células de cáncer de mama causada por la galoflavina. A.** Inhibición de la proliferación celular a 24 y 48h, **B.** Dosis de galoflavina causantes del 50% de inhibición de crecimiento celular (Farabegoli et al., 2012). # el conteo final de células fue menor a las cultivadas al inicio de los experimentos; no hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre líneas celulares

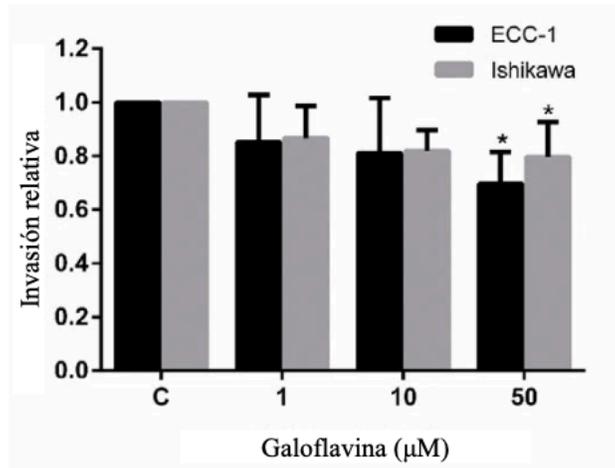
Regresando al concepto de evaluar el efecto antiproliferativo no sólo con porcentaje de inhibición, si no añadiendo la habilidad de formar colonias, otros autores realizaron dicho análisis en células PLC/PRF/5 (hepatoma) al exponer a éstas con oxamato o galoflavina (Fig. 42). Aunque no existe una diferencia significativa entre el efecto del oxamato y el de la galoflavina, se puede decir que fue logrado dicho efecto en esta línea celular (Manerba et al., 2017).



**Figura 42: Ensayo de formación de colonias en células PLC/PRF/5.** Las imágenes muestran las colonias teñidas con cristal violeta. El número de colonias se encuentran reportadas en la gráfica de barras. (Manerba et al., 2017). NS: no significativo

## Efectos antimetastásicos de la galoflavina

Después de un tratamiento de galoflavina por 24h, las células de cáncer endometrial: Ishikawa y ECC-1 mostraron una menor capacidad de invasión, (Fig. 43) y de manera significativa al utilizar 50  $\mu\text{M}$  (Han et al., 2015). Una vez más, aunque el efecto existe, las concentraciones utilizadas para llegar a este son muy altas para considerarse de manera clínica.



**Figura 43:** Las células ECC-1 e Ishikawa fueron cultivadas por 24h y después tratadas con galoflavina por 2 h. A través de Western Blot se observó una disminución en la invasión (Han et al., 2015).

\*P < 0.05

---

## Limitaciones de la galoflavina

Hasta el momento, la inhibición de la enzima LDH es el único efecto bioquímico descrito para la galoflavina. La dosis más alta administrada en ratones fue de 400 mg/kg (por inyección intraperitoneal) no produjo efectos letales, lo que sugiere que la molécula tiene buena tolerancia (Manerba et al., 2012). Aún así, la  $\text{CI}_{50}$  promedio es alrededor de 125  $\mu\text{M}$  (Farabegoli et al., 2012), la cual es una concentración alta en comparación con los quimioterapéuticos comunes y los que han sido mencionados durante este trabajo. Aunque la permeabilidad celular no parece ser un problema como fue para el caso del oxamato, dentro de este escrito existen mejores resultados involucrando las dosis y concentraciones necesarias para obtener los resultados deseados.

## 5. Conclusiones

El efecto Warburg y la reprogramación del metabolismo que conlleva son características comunes e importantes de las células cancerígenas para poder obtener mayores niveles energéticos y poder llevar a cabo los diferentes pasos de la tumorigénesis. La terapia dirigida es una modalidad evaluada y utilizada en el cáncer cada día más con el objetivo de inhibir enzimas específicas como la LDH u otras biomoléculas y ocasionar efectos fisiológicos importantes. Se ha dado un énfasis a compuestos con efectos antimetastásicos ya que este proceso es la causa de la mayoría de las muertes debido a este conjunto de enfermedades denominado cáncer.

Los objetivos establecidos se alcanzaron ya que se encontraron y presentaron diversas publicaciones indizadas sobre compuestos que afectan el funcionamiento de la LDH y presentan actividad antiproliferativa y antimetastásica en células cancerosas. Aunque existen diversas limitaciones para el uso clínico de dichos compuestos se logró discutir la contribución de éstos en la investigación de nuevas quimioterapias al inhibir la LDH. Un mayor conocimiento sobre las actividades antiproliferativas y antimetastásicas de los diferentes compuestos, en diferentes tipos de líneas celulares y diferentes manifestaciones del cáncer, sirve como base para mejorar los compuestos disponibles y como una herramienta para el desarrollo de nuevas estructuras.

## Referencias

- An, J., Zhang, Y., He, J., Zang, Z., Zhou, Z., Pei, X., . . . Song, L. (2017). Lactate dehydrogenase A promotes the invasion and proliferation of pituitary adenoma. *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04366-5>.
- Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2016). Tumour progression and metastasis. *eCancer*, <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.617>.
- Billiard, J., Dennison, J. B., Briand, J., Annan, R. S., Chai, D., Colon, M., . . . Greshock, J. (2013). Quinoline 3-sulfonamides inhibit lactate dehydrogenase A and reverse aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer & Metabolism*, <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-19>.
- Boudreau, A., Purkey, H., Hitz, A., Robarge, K., Peterson, D., Labadie, S., . . . O'Brien, T. (2016). Metabolic plasticity underpins innate and acquired resistance to LdHa inhibition. *Chemical Biology*, <https://doi.org/10.1038/nchembio.2143>.
- Calvaresi, E., Granchi, C., Tiziano, T., Di Bussolo, V., Huigens III, R., Lee, H., . . . Hergenrother, P. (2013). Dual Targeting of the Warburg Effect with a Glucose-Conjugated Lactate Dehydrogenase Inhibitor. *Chembiochem*, <https://doi.org/10.1002/cbic.201300562>.
- D'Andrea, F., Vageli, G., Granchi, C., Guazzelli, L., Tuccinardi, T., Poli, G., . . . Di Bussolo, V. (2019). Synthesis and Biological Evaluation of New Glycoconjugated LDH Inhibitors as Anticancer Agents. *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules24193520>.
- de la Cruz-López, K., Castro-Muñoz, L., Reyes-Hernández, D., García-Carrancá, A., Manzo-Merino, J., & , . (2019). Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Oncology*, <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01143>.
- Di Bussolo, V., Calvaresi, E., Granchi, C., Del Bino, L., Frau, I., Lang, M., . . . Macchia, M. (2015). Synthesis and biological evaluation of non-glucose glycoconjugated N-hydroxyindole class LDH inhibitors as anticancer agents. *RSC Advances*, <https://doi.org/10.1039/C5RA00946D>.

- Farabegoli, F., Vettrai, M., Manerba, M., Fiume, L., Roberti, M., & Di Stefano, G. (2012). Galloflavin, a new lactate dehydrogenase inhibitor, induces the death of human breast cancer cells with different glycolytic attitude by affecting distinct signaling pathways. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.08.012>.
- Feng, Y., Xiong, Y., Qiao, T., Li, X., Jia, L., & Han, Y. (2018). Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. *Cancer Medicine*, <https://doi.org/10.1002/cam4.1820>.
- Finch, N. (2017). The Effect of pH on Gossypol Inhibition of Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase. *Journal of McPherson College Science*, 25(16), Vol. 25, 16-21.
- Forkasiewicz, A., Dorociak, M., Stach, K., Szelachowski, P., Tabola, R., & Augoff, K. (2020). The usefulness of lactate dehydrogenase measurements in current oncological practice. *Cellular & Molecular Biology Letters*, <https://doi.org/10.1186/s11658-020-00228-7>.
- Galochkina, T., Ng Fuk Chong, M., & Challali, L. (2019). New insights into GluT1 mechanics during glucose transfer. *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37367-z>.
- GLOBOCAN. (2020). *Cancer Today*. Retrieved from International Agency for Research on Cancer: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=484&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=484&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&)
- Granchi, C., Calvaresi, E., Tuccinardi, T., Paterni, I., Macchia, M., Martinelli, A., . . . Minutolo, F. (2013). Assessing the differential action on cancer cells of LDH-A inhibitors based on the N-hydroxyindole-2-carboxylate (NHI) and malonic (Mal) scaffolds. *Organic & Biomolecular Chemistry*, <https://doi.org/10.1039/c3ob40870a>.
- Han, X., Sheng, X., Jones, H., Jackson, A., Kilgore, J., Stine, J., . . . Bae-Jump, V. (2015). Evaluation of the anti-tumor effects of lactate dehydrogenase inhibitor galloflavin in endometrial cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0097-x>.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9).
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Haschek, W., & Rousseaux, C. (2013). *Handbook of Toxicologic Pathology*. Londres: Elsevier.
- Hassouni, B., Franczak, M., Capula, M., Vonk, C., Gomez, V., Smolenski, T., . . . Giovannetti, E. (2020). Lactate dehydrogenase A inhibition by small molecular entities: steps in the right direction. *Oncoscience*, <https://doi.org/10.18632/oncoscience.519>.
- Johnson, S., Chen, H., & Lo, P.-K. (2013). In vitro Tumorsphere Formation Assays. *Bio-Protocol*, <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.325>.
- Judge, J., Nagel, D., Owens, K., Rackow, A., Phipps, R., Sime, P., & Kottman, R. (2018). Prevention and treatment of bleomycin- induced pulmonary fibrosis with the lactate dehydrogenase inhibitor gossypol. *Plos One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197936>.
- Kim, E.-Y., Chung, T.-W., Han, C., Park, S., Park, K., Jang, S., & Ha, K.-T. (2019). A Novel Lactate Dehydrogenase Inhibitor, 1-(Phenylseleno)- 4-(Trifluoromethyl) Benzene, Suppresses Tumor Growth through Apoptotic Cell Death. *Scientific Reports*, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40617-3>.
- Laikova, K., Oberemok, V., Karnsnodubets, A., Gal'chinsky, N., Useinov, R., Novikov, I., . . . Kubyshkin, A. (2019). Advances in the understanding of skin cancer: Ultraviolet radiation, mutations, and antisense oligonucleotides as anticancer drugs. *Molecules*, <https://doi.org/10.3390/molecules24081516>.
- Le, A., Cooper, C., Gouw, A., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L., . . . Dang, C. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, <https://doi.org/10.1073/pnas.0914433107>.

- Liberti, M., & Locasale, J. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in biochemical sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- Liu, X., Yang, Z., Chen, Z., Chen, R., Zhao, D., Zhou, Y., & Qiao, L. (2014). Effects of the suppression of lactate dehydrogenase A on the growth and invasion of human gastric cancer. *Oncology Reports*, <https://doi.org/10.3892/or.2014.3600>.
- Maftouh, M., Avan, A., Sciarrillo, R., Granchi, C., Leon, L., Rani, R., . . . Giovannetti, E. (2014). Synergistic interaction of novel lactate dehydrogenase inhibitors with gemcitabine against pancreatic cancer cells in hypoxia. *British Journal of Cancer*, <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.681>.
- Manerba, M., Di Ianni, L., Govoni, M., Roberti, M., Recanatini, M., & Di Stefano, G. (2017). LDH inhibition impacts on heat shock response and induces senescence of hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.015>.
- Manerba, M., Vettraino, M., Fiume, L., Di Stefano, G., Sartini, A., Giacomini, E., . . . Recanatini, M. (2012). Galloflavin (CAS 568-80-9): A Novel Inhibitor of Lactate Dehydrogenase. *ChemMedChem*, <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100471>.
- Mishra, D., & Banerjee, D. (2019). Lactate Dehydrogenases as Metabolic Links between Tumor and Stroma in the Tumor Microenvironment. *Cancers*, <https://doi.org/10.3390/cancers11060750>.
- Mortelmans, K., & Zieger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00064-6).
- National Cancer Institute. (2021). *Cancer*. Retrieved from NCI Dictionaries: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cancer>
- OMS. (2021). *Cancer Tomorrow*. Retrieved from [https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?populations=484&group\\_populations=1&multiple\\_populations=1&single\\_unit=10000](https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?populations=484&group_populations=1&multiple_populations=1&single_unit=10000)

- OMS. (2021). *Cáncer*. Retrieved from Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Pérez-Tomás, R., & Pérez-Guillén, I. (2020). Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers*, <https://doi.org/10.3390/cancers12113244>.
- Pizon, M., Schott, D., Pachmann, U., & Pachmann, K. (2016). The number of tumorspheres cultured from peripheral blood is a predictor for presence of metastasis in patients with breast cancer. *Oncotarget*, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10174> .
- Rani, R., & Kumar, V. (2016). Recent Update on Human Lactate Dehydrogenase Enzyme 5 (hLDH5) Inhibitors: A Promising Approach for Cancer Chemotherapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00168>.
- Rellinger, E., Craig, B., Alvarez, A., Dusek, H., Kim, K., Qiao, J., & Chung, D. (2017). FX11 Inhibits Aerobic Glycolysis and Growth of Neuroblastoma Cells. *Surgery*, <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.09.009>.
- Shelley, M., Hartley, L., Fish, R., Groundwater, P., Morgan, J., Mort, D., . . . Evans, A. (1999). Stereo-specific cytotoxic effects of gossypol enantiomers and gossypolone in tumour cell lines. *Cancer Letters*, 171-180.
- Syed, M. A. (2016). Therapeutic significance of quinolines: a patent review (2013-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1216545>.
- Thews, O., & Riemann, A. (2019). Tumor pH and metastasis: A malignant process beyond hypoxia. *Cancer and Metastasis Reviews*, <https://doi.org/10.1007/s10555-018-09777-y>
- Valvona, C. J., & Filmore, H. L. (2018). Oxamate, but Not Selective Targeting of LDH-A, Inhibits Medulloblastoma Cell Glycolysis, Growth and Motility. *Brain Sciences*, 8(56), <https://doi.org/10.3390/brainsci8040056>.

- Vander Heiden, M., Cantley, L., & Thompson, C. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- Wang, Y., Lai, H., Fan, X., Luo, L., Duan, F., Jiang, Z., . . . Yao, X. (2018). Gossypol Inhibits Non-small Cell Lung Cancer Cells Proliferation by Targeting EGFRL858R/T790M. *Frontiers in Pharmacology*, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00728>.
- Ward, P., & Thompson, C. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.014>.
- Weinberg, R. (2014). *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science.
- Xian, Z.-Y., Liu, J.-M., Chen, Q.-K., Chen, H.-Z., Ye, C.-J., Xue, J., . . . Kuang, S.-J. (2015). Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumor Biology*, <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3540-x>.
- Xie, H., Hanai, J.-i., Ren, J.-G., Kats, L., Burgess, K., Bhargava, P., . . . Seth, P. (2014). Targeting lactate dehydrogenase-A inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor initiating cells. *Cell Metabolism*, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.003>.
- Yu, Y., Deck, J., Hunsaker, L., Deck, L., Royer, R., Goldberg, E., & Vander Jagt, D. (2001). Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochemical Pharmacology*, [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00636-0](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00636-0).
- Zhao, J., Huang, X., Zhaoping, X., Jun, D., Hongchao, H., Zhu, Y., & Haofei, W. (2017). LDHA promotes tumor metastasis by facilitating epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7637>.
- Zugazagoitia, J., Guedes, C., Ponce, S., Ferrer, I., Molina-Pinelo, S., & Paz-Ares, L. (2016). Current Challenges in Cancer Treatment. *Clinical Therapeutics*, 38(7), <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>.

