



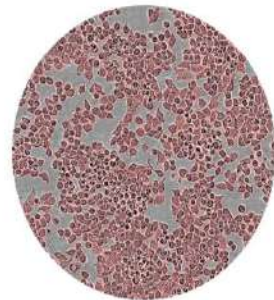
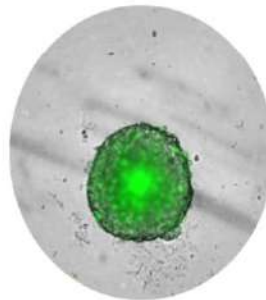
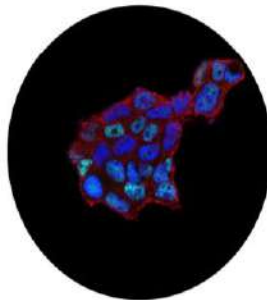
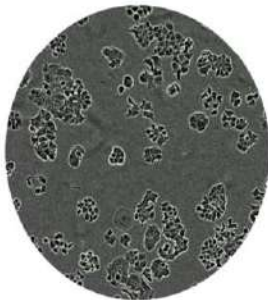
**ULPGC**

**Universidad de  
Las Palmas de  
Gran Canaria**

**Instituto Universitario de  
Investigaciones Biomédicas  
y Sanitarias**

## **TESIS DOCTORAL**

**Identificación y evaluación preclínica de  
nuevas moléculas de pequeño tamaño  
con actividad antitumoral en cáncer de  
mama dependiente de estrógenos**



---

Miguel Alfonso Guerra Rodríguez

---

Programa de Doctorado: Investigación en Biomedicina

Departamento de Ciencias Clínicas

Las Palmas de Gran Canaria, 2022









Programa de Doctorado: Investigación en Biomedicina

Departamento de Ciencias Clínicas

Grupo de Investigación en Farmacología Molecular y Traslacional

Título de la Tesis:

**Identificación y evaluación preclínica de nuevas  
moléculas de pequeño tamaño con actividad antitumoral  
en cáncer de mama dependiente de estrógenos**

Opta a la Tesis Doctoral con Mención Internacional

Miguel Alfonso Guerra Rodríguez

Las Palmas de Gran Canaria, a 27 de octubre de 2022



D/D<sup>a</sup>..... **COORDINADOR/A**  
**DEL** **PROGRAMA** **DE**  
**DOCTORADO**..... **DE LA**  
**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA**

**INFORMA,**

De que la Comisión Académica del Programa de Doctorado, en su sesión de fecha ..... tomó el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación, a la tesis doctoral titulada "....." presentada por el/la doctorando/a D/D<sup>a</sup>..... y dirigida por el/la Doctor/a.....

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el Artº 11 del Reglamento de Estudios de Doctorado (BOULPGC 04/03/2019) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Las Palmas de Gran Canaria, a...de.....de dos mil.....



**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA  
ESCUELA DE DOCTORADO**

Programa de Doctorado: **Investigación en Biomedicina**

Título de la Tesis: **Identificación y evaluación preclínica de nuevas moléculas de pequeño tamaño con actividad antitumoral en cáncer de mama dependiente de estrógenos**

Tesis Doctoral presentada por D/D<sup>a</sup>: **Miguel Alfonso Guerra Rodríguez**

Dirigida por el Dr. D/D<sup>a</sup>: **Leandro Francisco Fernández Pérez**

Codirigida por la **Dra. D/D<sup>a</sup> Carlota Pilar Recio Cruz** y el **Dr. Carlos Borja Guerra Hernández**

Las Palmas de Gran Canaria, a **26 de octubre de 2022**





## AGRADECIMIENTOS

**A mis PADRES, a JOSÉ, a PATRI y a mi FAMILIA, tanto de sangre como adquirida. Infinitas gracias.**

Llevo mucho tiempo fantaseando con escribir esta sección de mi Tesis. Quizás, demasiado. Llegar a este punto significa que estoy cerca, muy cerca de acabar esta etapa vital de tanto aprendizaje, conocimiento y crecimiento personal, pero también de erosión, desgaste físico, emocional y mental. Cuando me imaginaba redactando estas líneas, tenía la firme intención de respetar y autoimponerme dos consignas: 1) los agradecimientos debían ser claros, concisos y, esperaba que por el bien de todos, breves; 2) cuidar y usar las palabras adecuadas para agradecer muchísimo a tanta gente y no ofender a lo que denominaré abstractamente como “El Sistema”. Respecto a la primera premisa, quienes hayan tenido la desgracia o la fortuna de conocerme un poco saben que me enredo como una persiana y adelanto que no voy a ser capaz de cumplirla. En relación con la segunda consigna, deseo y espero no olvidarme de nadie, y si lo hiciera, quiero disculparme de antemano. En cuanto al “Sistema”, trataré de traicionar mis propios principios y “morderme la lengua”, para de esta forma darle el menor protagonismo posible. Toda persona interesada en conocer mi historia puede contactar conmigo y podremos hablar sin tapujos con un café o un par de cervezas delante.

Como dirían mis padres, ejes incondicionales de mi vida, “Al turrón hijo”. De modo que, allá voy.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tres directores por haberme abierto la puerta a esta experiencia tan intensa y espero, que a la larga, enriquecedora. Agradezco la confianza depositada en mí y todas las enseñanzas trasladadas desde sus diversos y valiosos puntos de vista, aunque no siempre hayamos estado de acuerdo.

- A Leandro, por enseñarme a ser riguroso y trasladarme mis primeros conocimientos teóricos y prácticos en los cultivos celulares y la farmacología.
- A Borja, por compartir tus conocimientos, no solo en el terreno académico, sino también en aspectos tan importantes como la comunicación de gratificación o felicitación cuando las cosas salen bien. Agradezco que hayas sido ese *buffer*, que muchas veces se necesita para acabar un experimento con éxito y esas enseñanzas de “no morirnos en la víspera” cuando las cosas no siempre salían como esperábamos. Agradezco también tu trabajo en las correcciones de esta tesis.
- A Carlota, por aparecer y, posiblemente, impedir que abandonara en alguna que otra ocasión, en la que mi cabeza y mi cuerpo no daban para más. Gracias por haber sido mi confidente, en especial en los primeros años de tesis, trasladarme tu alegría y

compartir conmigo todo tu bagaje vital. Gracias por tramitar mi estancia en Birmingham y devolverme, aunque fuera unos meses, la ilusión en la ciencia. Gracias por darle el empujón que necesitaba el artículo de la tesis para poder cerrar esta etapa y también por tus contribuciones y trabajo de corrección a la misma. Gracias por haber mostrado siempre una confianza tan plena y amplia en mí, contradiciendo al “Sistema”, y demostrando que otro tipo de Academia, donde las personas tienen valor y emociones, es posible.

- To Asif Iqbal, who without being my thesis director (supervisor at the University of Birmingham), has played a crucial role in my research development, in my scientist maturity. From the first minute you placed all your trust in me. You brought my self-confidence back as a researcher, whose degradation has been catalyzed sometimes by “the system” and other times by myself. You are the supervisor that every PhD student has dreamt about to have. It’s a real privilege to have spent three months with you and prioritizing wellness and mental health over academia.

Agradezco al entonces Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, la financiación para la Formación de Profesorado Universitario, otorgada a través de la beca FPU (FPU16/00233) de la que fui beneficiario. Aunque sigue siendo imperativo la necesidad de mejoras en el Sistema Nacional de Ciencia, me considero afortunado de haber disfrutado de financiación la mayor parte del desarrollo de mi Tesis Doctoral.

Agradezco a la ULPGC que allá por 2017, finalmente (también gracias a mi tenacidad e insistencia), me facilitara el acceso al Doctorado con la beca que con mi CV y mi esfuerzo me había ganado. Agradezco manifiestamente, la excelente gestión de mi contrato predoctoral por Gerardo y el equipo del negociado de Becas de la ULPGC. También la financiación otorgada que me permitió hacer una estancia predoctoral en la Universidad de Birmingham con el programa Erasmus+Prácticas (SMT).

Traslado también mi agradecimiento a todos los miembros del equipo de Química Orgánica de la ULL (QUIBIONAT), fundamentalmente en términos de cooperación y materia de financiación cuando hubo falta de liquidez. Sin ellos, este proyecto multidisciplinar no habría sido posible. Pris, gracias a ti, de forma concreta por tantas conversaciones, puentes tendidos y desahogos.

Agradezco a todos mis compañeros y compañeras de la ULPGC, del antiguo CULP y el actual IUIBS, toda ayuda prestada en materia de soporte teórico, técnico, vital o emocional. Gracias igualmente a todos mis compis de laboratorio de la estancia en la Universidad de Birmingham. A algunos de ellos, tengo el lujo de haberlos ganado como amigos. Agradezco todos esos cafés, comidas y charlas, casi nunca de ciencia, mantenidas en esos ratitos y que tan

importantes son para afrontar los días. Gracias también a toda persona de la ULPGC, que en algún momento se ha cruzado en mi camino e igualmente me ha dado su punto de vista o ha intentado hacerme las cosas un poquito más fáciles.

Escoger la senda de la carrera investigadora es una decisión que no debería tomarse tan a la ligera. Es un recorrido espinoso, áspero y muy duro, donde continuamente luchas contra todo un “Sistema” estratégicamente planteado, en el que irremediablemente vas a quemarte por el camino. Pero también se establece una lucha aguerrida contra ti mismo. O ese ha sido mi caso. El aislamiento y la precarización tan fuerte que experimentas, te lleva a desarrollar cambios conductuales y emocionales, que se manifiestan en una sistemática pérdida de la ilusión y las ganas de cambiar tu mundo. En este proceso, yo me he vuelto agrio, he perdido parte de mi chispa, he desarrollado el síndrome del impostor, se ha quebrado mi autoestima como persona y se ha comprometido mi salud mental. Desde este humilde espacio, reclamo el derecho a poner en valor la salud mental de las personas y aprovecho la tesitura para agradecerle a Cristina, mi terapeuta, todas sus enseñanzas y el trabajo realizado para sacarme del lodazal cuando toqué fondo. Si estoy atreviéndome a plasmar todo esto por escrito es, porque, aunque en muchos momentos es inevitable sentirse perdido ante semejante huracán de sentimientos, tengo la enorme suerte de contar con un auténtico ejército de personas que me ha soportado, guiado, ayudado, empujado y querido para completar con éxito esta gris etapa. Por todo ello, continúo esta larga sección de agradecimientos:

Quiero empezar contigo Patri (mi Patri del labo), por ser un ejemplo de mujer superheroína. Madre, investigadora, compañera y amiga. Me has enseñado y ayudado muchísimo con una paciencia y una dedicación infinita. Nunca pediste nada a cambio. Eres muy grande. Y si lees esto, recuerda lo que ocurre todos los viernes y la alegría tan grande de levantar los brazos y decir eso de... Continúo con Car, ya te dediqué unas palabras como directora, pero también me has conquistado como compañera y amiga. Gracias por todas las conversaciones, por esos cafés/cigarritos exprés, por las risas y las críticas deliberadas al “Sistema”. Te toca a ti Haidée. Eres una mujer excepcional y maravillosa, esa compañera, amiga y conviviente de laboratorio a la que también debo no haber tirado la toalla ni abandonado esta pelea. Me has instruido, enseñado y ayudado tantísimo en tantos aspectos, que te estaré eternamente agradecido. Te admiro mucho como investigadora y persona. Y te quiero mucho, amiga, hermana, mi Brocki. Desde el principio fuiste mi ejemplo a seguir y ojalá poder tenerte siempre en mi equipo de vida. Joaquín o como muchas veces han retumbado los pasillos, Mambo Kings I El Turolense. Fue verte llegar y establecer un vínculo casi inmediato. Sé que actualmente eres muy feliz de haberte librado de este intenso compañero de despacho, pero espero que algún día recuerdes con cariño la cantidad de tonterías que pudimos hacer en un espacio tan pequeño. En términos de ciencia, eres una fuente inagotable de consejos, de ideas, de soluciones. Gracias por todas tus aportaciones y consejos. En

lo personal, también te ganaste muy rápido un huequito en mi corazón, pese a que odies mis abrazos y mi pachorra. Redactando la tesis desde casa te he echado mucho de menos y tenerte cerca todo el camino ha sido también una suerte increíble. Gracias mi niño, te quiero mucho y ojalá también conservarte en mi equipo de vida. A Elena, Ester, Henoc y Marian, mi equipo de “protodoctores” que tantos ratitos de risas, desahogos y ayuda me han brindado. Aunque por mi organización hayamos coincidido menos de lo que me hubiera gustado disfrutarles, también han sido claves. A todos los alumnos en prácticas, de TFG, TFM y doctorandos que han compartido espacio, tiempo y experimentos conmigo. Enseñándoles todo lo que he podido, no he dejado de aprender de ustedes, de hacerme preguntas y de demostrarme a mí mismo, que soy mucho más válido de lo que en repetidas ocasiones el “Sistema” ha pretendido insinuar. A Anita, Rober, Yeray, Uxue, Estrella, Silvia, Laura R., Laura P., Carmen, Merci, Rosa, Dácil, Tina, Vladi, Antonio, Carlos, Cristina y Elena Predimed, a Cristóbal de carburos metálicos. A Danielle y Franzi, mis compis de labo de Birmingham. Gracias por todo.

Quiero dedicar también unas líneas al deporte, como mi vía de escape y mi punto de unión a la realidad, siendo también una poderosa razón de que las consecuencias emocionales de haber hecho la tesis no hayan sido más desastrosas. En particular, me gustaría agradecer a los tres equipos de fútbol regional que tanto me han aportado en esta larga travesía. Gracias a presidentes, cuerpos técnicos, entrenadores y especialmente a jugadores del Acodetti C.F., U.D. Moya y U.D. Muelle Grande.

Me toca agradecer y mucho a los amigos: los que han estado, los que están y los que espero que continúen a mi lado. A las personas que me he ido tropezando en las ciudades que he vivido y que pese a conocerme bien, me aceptan y me quieren. Gracias Nico por aparecer en el último año de nuestra RUPI, eres mi hermanito grande y cada vez que podemos pasar un rato juntos, me regalas alegría. Gracias Lippi (mi delfín apoptótico hasta el fin), Cris Dalai (mi primera amiga psicóloga y guía espiritual), Raquel (mi adorable vecina) e Inés (mi bióloga-veterinaria) por aparecer también en Tenerife y quedarse con todas mis versiones. Gracias País Vasco y Vitoria por regalarme a personas tan bonitas como Lorea, Gemm, Nerea, Jontxu, Estitxu, Ane, Gerard, Rebeca, que hoy en día permanecen y estoy seguro de que lo harán con el paso de los años. Gracias Salamanca, por regalarme a Marina, la mejor compañera de piso del mundo. Eres uno de mis mayores descubrimientos vitales y soy muy afortunado de tenerte tan cerca, estando físicamente tan lejos. Gracias por estar siempre y brindarme infinito apoyo. A Alexandra, por convertirte en mi pilar durante la estancia y mi personita *nice* que me llevo del corto período en Birmingham. A todos, ya saben que los quiero mucho.

Mil gracias al apoyo de los de siempre. A mis amigos de la época del cole (mi hermanito Elías, Lisa mi BFE, mi Alba la peque), del instituto IES el Rincón y de Las Canteras-Guanarteme (Adri cari cari; Josu mi tontón alpha; Kevin mi negrete; Borja el caballero de Lavapiés; Amanda mi Plumpy; Néstor, que haces ahí Néstor, bájate de ahí Néstor). Gracias por el apoyo emocional, por sus fuerzas, su aliento, por todas las conversaciones, las risas, las fotos, las fiestas y planes que insuflaron aire fresco, especialmente en momentos de mayor vulnerabilidad.

A las más recientes incorporaciones a mi elenco de gente, que tienen pinta de quedarse para compartir y sumar más momentos. A Bea, por crear nuestro grupo burbuja y un espacio seguro en el que ser y estar, sin parecer. A Lau por esos juegos de mesa, *scape rooms* y ratitos de enrrole. A Natalia y Nico, por conectar conmigo tan fácil y regalarme sonrisas cada vez que podemos pasar un rato juntos. A Raquel, por dejarme descubrir a una persona maravillosa, que no deja de sorprenderme. A todos, gracias por dedicarme tiempo, escuchar, ayudarme a desconectar y disfrutar.

A esas personas que sin esperarlo aparecen en tu vida y se convierten en indispensables e insustituibles: Samuuu y Sara Chu Chu. Tremendos descubrimientos. Gracias por aparecer, por fluir, por darme tantas lecciones, por haberse convertido en personas tan importantes para mí. Sin buscarlo ni forzarlo, gracias por aportarme justo todo aquello que necesitaba en cada momento, interpretando mi estado de ánimo como si me conocieran desde la cuna.

Mención especial para Gabri, mi Manito, mi Meinoak. Gracias por demostrarme desde que tenemos dos añitos, el incalculable valor de la amistad incondicional. Eres uno de mis referentes y nunca estaré suficientemente agradecido contigo. Te quiero más que a la UD carajo.

Gracias a Patri (mi Patri), mi Tití. Eres un inmenso regalo y tengo suerte de tenerte como compañera de vida. Gracias por cuidarme y aceptarme. No es solo todo el amor y el cariño que proyectas a diario. Es el ánimo, la confianza, el coraje, el apoyo, el empuje, el equilibrio que siempre me has brindado, desde que éramos solo amigos. Has vivido todo mi proceso y me siento especialmente en deuda contigo. Te quiero mucho. Eres una persona mágica y preciosa, de todos los quilates del mundo.

Y por supuesto, gracias a toda mi familia en peso. Empezando por la Yeyi, seguido de las Tantis y Onkelitos, los y las Primis Besuconas, que tanto han influido en la persona que soy hoy. Gracias a José, mi hermanito pequeño que siempre tanto me enseña y me cuida. En muchos rasgos de la personalidad somos opuestos y eso hace que aprenda muchísimo de ti y tu manera tan bonita de ver la vida. Gracias por tus consejos, tu energía y tu cariño. Gracias por ser como eres. Tengo muchísima suerte de tenerte, compartir juntos y disfrutarte cada día.

Finalmente, gracias a mis dos grandes referentes vitales: mi padre y mi madre. Su amor incondicional siempre ha sido mi motor, incluso cuando no he sido capaz de ver que había alguien moviendo este barco y no era yo el que remaba. Se lo debo absolutamente todo a ustedes. Gracias por creer, alentarme, cuidarme y luchar conmigo hasta el final de la otra orilla. Sin este apoyo, habría naufragado. Gracias, gracias, gracias. Los quiero mucho, infinitamente.

Esta experiencia me ha marcado de muchas maneras. Me toca recomponerme, recuperarme y sanar, con espacio y tiempo. De corazón, gracias a todos por acompañarme en esta travesía y ayudarme a llegar a la meta.



## RESUMEN

El cáncer de mama es la patología tumoral más frecuente y letal en mujeres a nivel global. Cerca del 70 % de los tumores mamarios diagnosticados son ER+ y dependen de los estrógenos y la interacción con sus receptores estrogénicos (ER) para crecer y sobrevivir. Su tratamiento terapéutico es de los de mejor pronóstico clínico, efectividad y supervivencia libre de enfermedad. Sin embargo, la resistencia al tratamiento antitumoral, así como los efectos adversos indeseados (quistes ováricos, cáncer de endometrio o coágulos sanguíneos) implican importantes limitaciones clínicas. Esto justifica el desarrollo de nuevos fármacos capaces de modular las actividades de los ER, al considerarse dianas terapéuticas clínicamente validadas.

El objetivo de la presente Tesis Doctoral es la identificación y evaluación farmacológica preclínica de nuevas estructuras con propiedades antitumorales y/o antiestrogénicas con mecanismos de acción alternativos o complementarios a la terapia endocrina empleada en el tratamiento actual de referencia del cáncer de mama ER+. Para ello, se efectuó un cribado farmacológico de once quimiotecas basadas en motivos estructurales presentes en productos naturales bioactivos, identificando aquellos productos que disminuían significativamente la viabilidad de los modelos celulares de cáncer de mama estudiados. Tres de las quimiotecas (PSx, LGx y PLRx) fueron exploradas en mayor profundidad, con el objetivo de detectar compuestos con potencialidad terapéutica como moduladores o degradadores selectivos de los ER, respectivamente. Las propiedades biológicas de estos compuestos fueron evaluadas mediante un cribado farmacológico mixto (basado en el fenotipo y en la diana terapéutica del ER) y un cribado virtual de sus interacciones moleculares (*docking* molecular) con el ER $\alpha$  en cáncer de mama ER+. Se identificaron los productos líderes de cada quimioteca, se determinaron relaciones estructura-actividad y se describieron sus efectos estro- y antiestrogénicos específicos, su afinidad de unión al ER $\alpha$ , así como algunos de sus valores predictivos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Los resultados obtenidos permitieron la selección de la quimioteca de los productos PLRx, y en concreto los PLR-56 y PLR-67, como líderes para estudiar en profundidad sus características biológicas. Estos compuestos exhibieron una potente actividad antitumoral sobre diferentes estirpes de cáncer de mama y de endometrio ER+, destacando, especialmente, su efecto antiestrogénico y antiproliferativo en cultivos celulares 2D y 3D, con escasa citotoxicidad en células de mama sanas. Los efectos antiproliferativos inducidos por ambos compuestos se explicaron, parcialmente, por el bloqueo de las fases subG1 y G0/G1 del ciclo celular, con una disminución concomitante en las fases G2/S/M; y la activación de apoptosis. Los ensayos de inmunodetección de proteínas mostraron un efecto inhibitorio de los productos sobre la expresión del ER $\alpha$  en células de cáncer de mama ER+, donde el PLR-67 incrementó los niveles de proteínas poliubiquitinadas. Estos datos se correlacionaron con la inhibición transcripcional del gen *ER $\alpha$*  tanto en cáncer de mama como de endometrio ER+, detectándose adicionalmente una inhibición

de la transcripción mediada por STAT5 en cáncer de mama ER+. El PLR-56 no alteró la expresión génica de *ERα*, pero sí de *PR* e inhibió la transcripción dependiente de STAT3 en cáncer de mama ER+. Ambos productos disminuyeron la actividad enzimática fosfatasa alcalina, con un leve o nulo efecto uterotrófico, lo que resulta clínicamente relevante. Finalmente, los ensayos de combinación de ambos productos con 4-OHT demostraron potenciar su eficacia antitumoral *in vitro*, lo que podría permitir la reducción de las dosis empleadas en la combinación, lo que limitaría en teoría, la aparición de fenómenos de resistencia ligadas al tratamiento.

Por tanto, esta Tesis Doctoral demuestra el éxito de la estrategia de cribado mixta, la cual ha permitido identificar nuevas entidades químicas con potencialidad antitumoral y antiestrogénica en el contexto del cáncer de mama y endometrio ER+.

## SUMMARY

Breast cancer is the most common and lethal women tumor pathology worldwide. About 70 % of the breast tumors diagnosed are ER+ and depend on estrogens and the interactions with their estrogen receptors (ER) to grow and survive. Their therapeutic treatment has a good clinical prognosis, effectiveness, and disease-free survival. However, antitumoral treatment resistances and undesirable side effects (ovarian cysts, endometrial cancer, or blood clots) remain clinically challenging. This justifies the development of new drugs that modulate ER activity, since its considered a clinically validated therapeutic target.

The goal of this Thesis is the identification and the preclinical pharmacological evaluation of new structures with antitumoral and/or antiestrogenic properties with alternative or complementary mechanisms of action to the endocrine therapy used in the gold-standard treatment of ER+ breast cancer. For this purpose, a pharmacological screening of eleven chemical libraries was carried out based on structural motifs of bioactive natural products, identifying products that significantly decreased the viability of different breast cancer cell models. Three of the chemical libraries (PSx, LGx and PLRx) were further explored, with the aim of detecting potential Selective Estrogen Receptor Modulators or Degraders. Compounds biological properties were evaluated following a mixed pharmacological screening strategy (based on the phenotype and on the therapeutic target of the drug) in ER+ breast cancer cells, and a virtual screening of its molecular interactions (molecular docking) with ER $\alpha$ . The leading products of each chemical library were identified, the structure-activity relationships were determined and their specific estrogenic and antiestrogenic effects were characterized. Furthermore, the binding affinity to ER $\alpha$ , as well as some of their absorption, distribution, metabolism, and excretion predictive values were described. The results permitted the selection of the PLRx chemical library, specifically PLR-56 and PLR-67, as leading compounds to study their biological features in depth. These products exhibited potent antitumoral activity on different ER+ breast and endometrial cancer cells, specially highlighting their antiestrogenic and antiproliferative effects in 2D and 3D cell cultures, with low cytotoxicity in healthy breast cells. The antiproliferative effects induced by both compounds were partially explained by the blockade generated in the subG1 and G0/G1 phases of the cell cycle, with a concomitant decrease in the G2/S/M phases; and the activation of apoptosis.

Immunodetection assays showed an inhibitory effect of both products on ER $\alpha$  expression in ER+ breast cancer cells, where PLR-67 increased polyubiquitinated protein levels. These data correlated with the transcriptional inhibition of the *ER $\alpha$*  gene in both ER+ breast and endometrial cancer cells and additionally, with the inhibition of STAT5 mediated transcription in ER+ breast cancer. PLR-56 did not alter *ER $\alpha$*  gene expression, but it strongly inhibited *PR* in breast and endometrial cells, as well as STAT3 dependent transcription in ER+ breast cancer. Both products

decreased alkaline phosphatase enzymatic activity, with scarce or null uterotrophic effects, which might be clinically relevant. Finally, combination assays of both products with 4-OHT showed to potentiate their antitumoral efficacy *in vitro*, which could involve a reduction in the doses used in the combination, thus potentially limiting, the appearance of resistances linked to treatment.

Therefore, this Thesis demonstrates the success of the mixed screening strategy, which enables the identification of new chemical entities with antitumoral and antiestrogenic potential in the context of ER+ breast and endometrial cancer.

## ABREVIATURAS

Para muchas de las abreviaturas se emplea el nombre en inglés por su universalidad en el lenguaje científico o por su utilización en tablas y figuras.

Ab	Antibodies / Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AF-1	Activation Function-1 / Función Activadora-1
AF-2	Activation Function-2 / Función Activadora-2
ALP	Alkaline Phosphatase / Fosfatasa Alcalina
AP1	Activator Protein-1
AR	Androgen Receptor / Receptor de Andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Area Under the Curve / Área bajo la curva
BIOS	Biologically Oriented Synthesis / Síntesis Orientada Biológicamente
BCA	Bicinchoninic Acid / Ácido Bicinconínico
BLAs	Solicitudes de Licencias Biológicas
BL1	Basal-like 1
BL2	Basal-like 2
BSA	Bovine Serum Albumine / Albúmina de Suero Bovino
CA-4	Combretastatina-A4
CDER	Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos
CI	Combination Index / Índice de Combinación
CIx	Cell Index / Índice Celular
CKB	Creatine Kinase B / Creatina Quinasa B
CREB	cAMP response element-binding Protein
CtD	Complexity to Diversity / Aproximación de complejidad hacia la diversidad
CDK	Cyclin Dependent Kinase / Quinasa dependiente de ciclina
CK	Cytokeratin / Citoqueratina
Ct	Cycle Threshold / Umbral de ciclo
CYP	Cytochrome P450 / Citocromo P450
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA-Binding Domain / Dominio de Unión al ADN
DCIS	Ductal Carcinoma <i>in situ</i> / Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido

DOS	Diversity-Oriented Synthesis/ Síntesis Orientada a la Diversidad
DOXO	Doxorrubicina
DPN	2,3-bis(4-hydroxyphenyl) propionitrile
DEX	Dexametasona
E2	17- $\beta$ -Estradiol
ED	Effective Dose / Dosis efectiva
EE2	17 $\alpha$ -Ethinyl-Estradiol
EGF	Epidermal Growth Factor / Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor / Receptor del EGF
END	Endoxifen / Endoxifeno
EPA	Environmental Protection Agency / Agencia de Protección Medioambiental
ERBB2 – HER2/Neu	Human epidermal growth factor receptor 2
ER	Estrogen Receptor / Receptor de estrógenos
ERE	Estrogen Response Elements / Elementos de respuesta a estrógenos
FBS	Fetal Bovine Serum / Suero Bovino Fetal
FDA	Food and Drug Administration / Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSH	Follicle Stimulating Hormone / Hormona foliculoestimulante
4-OHT	4-Hidroxi-Tamoxifeno
GH	Growth Hormone / Hormona de Crecimiento
GnRH	Gonadotropin-releasing Hormone / Hormona liberadora de gonadotropinas
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCRs	G Protein-Coupled Receptors / Receptores acoplados a proteínas G
GPER (GPR30)	G Protein-Coupled Estrogen Receptor / Receptor de estrógenos acoplado a Proteína G
GR	Glucocorticoid Receptor / Receptor de glucocorticoides
HB-EGF	Heparin-bound growth factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Induced Factors / Factores inducidos por hipoxia
HPG	Hypothalamic-Pituitary-Gonadal / Hipotalámico-hipofisario-gonadal
I	Immunomodulatory / Inmunomodulador
ICI	ICI 182,780
IDC	Invasive Ductal Carcinoma / Carcinoma ductal invasivo
IGFR1	Insulin Growth Factor Receptor
IL	Interleukin / Interleucina
ILC	Invasive Lobular Carcinoma / Carcinoma lobular invasivo

IMM	Immunomodulatory
INSR	Insulin Receptor / Receptor de Insulina
IUBO	Instituto Universitario de Bio-Organica
IUIBS	Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LAR	Luciferase Assay Reagent
LBD	Ligand-Binding Domain / Dominio de Unión al Ligando
LBDD	Ligand based Drug Design
LCIS	Lobular Carcinoma <i>in situ</i> / Carcinoma lobular <i>in situ</i>
L-Glutn	L-Glutamine / L-Glutamina
LH	Luteinizing Hormone / Hormona luteinizante
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LUAR	Luminal Androgen Receptor
M	Mesenchymal-like
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEBM	Mammary Epithelial Basal Medium
MEGM	Mammary Epithelial Growth Medium
μM	Micromolar
MISS	Membrane-initiated Steroid Signaling
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MSL	Mesenchymal/stem-like
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Tetrazolium salt 3-(4,5-methyliazol- 2yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide
NaPyr	Sodium Pyruvate / Sodio Piruvato
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NIH/NCI	National Cancer Institute / Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU
NISS	Nuclear-initiated Steroid Signaling
nM	Nanomolar
NMEs	New Molecular Entities / Nuevas entidades moleculares
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development / Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells/ Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Phosphate-buffered Saline / Tampón fosfato salino
PCR	Polimerase Chain Reaction / Reacción en cadena de la polimerasa



PBD	Protein Data Bank
PDD	Phenotypic-based drug discovery / Descubrimiento de fármacos basado en el fenotipo
p-DOS	Diversity-oriented synthesis pathways
PEST	Penicillin/Streptomycin / Penicilina/Estreptomicina
PI3K/PKB	Phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLB	Passive Lysis Buffer
PPT	1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole
PR	Progesterone Receptor / Receptor de Progesterona
pSOD	Privileged Structure Oriented Synthesis
RAL	Raloxifene / Raloxifeno
Ras-MAPK	Rat sarcoma-Mitogen-Activated Protein Kinase
ROS	Reactive Oxygen species / Especies reactivas de oxígeno
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
RUC	Rat Uterine Cytosol / Citosol uterino de rata
SAR	Structure-Activity Relationships
SBDD	Structural based Drug Design
SDS	Sodium-Dodecyl Sulfate
SERD	Selective Estrogen Receptor Degradar / Degradador selectivo de los Receptores de Estrógenos
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator / Modulador selectivo de los Receptores de Estrógenos
STEAR	Selective Tissue Estrogenic Activity Regulator
SOD	Diversity Oriented Synthesis / Síntesis orientada a la diversidad
SP1	Specificity Protein-1
STAR	Study of Tamoxifen and Raloxifene
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
STP	Estaurosporina
TBS-T	Tris-buffered saline-Tween 20
TDD	Target-based Drug discovery / Descubrimiento de fármacos basado en la diana
TEST	Testosterona
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
UTR	Untranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEH	Vehículo
WB	Western Blot

# ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	7
1. <b>Cáncer</b> .....	9
1.1. Definición y generalidades .....	9
1.2. Características identitarias del Cáncer .....	9
2. <b>Cáncer de mama</b> .....	11
2.1. Generalidades .....	11
2.2. Epidemiología .....	12
2.2. Clasificación del cáncer de mama .....	13
3. <b>Cáncer de mama estrógeno positivo (ER+)</b> .....	15
3.1. Tipos de cáncer de mama estrógeno positivo (ER+) .....	15
3.2. Descripción y relevancia fisiológica de los estrógenos y sus receptores .....	16
3.3. Los Receptores de Estrógenos .....	19
3.3.1. Generalidades .....	19
3.3.2. Estructura de los ER $\alpha$ y ER $\beta$ .....	20
3.3.3. Equilibrio en el nivel de expresión ER $\alpha$ /ER $\beta$ . .....	22
3.3.4. Isoformas de ER $\alpha$ y ER $\beta$ .....	23
3.3.5. Distribución tisular y localización subcelular de los ER.....	24
3.3.6. Receptores de estrógenos asociados a la membrana plasmática .....	25
3.4. Vías de señalización celular reguladas por los ER .....	26
3.4.1. Vías de señalización de los ER dependientes de ligando .....	27
3.4.1.1. Vía de señalización genómica, directa o dependiente de ERE .....	27
3.4.1.2. Vía de señalización por interacciones proteína-proteína, vía “ <i>tethered</i> ” .....	27
3.4.1.3. Vía de señalización no genómica o indirecta .....	28
3.4.2. Vías de señalización de los ER independientes de ligando .....	29
3.5. Interconexión entre la ruta de los ER y otras vías de señalización intracelular .....	29
3.6. Regulación negativa de la ruta de los ER .....	30
3.7. Importancia de la vía de señalización de los ER en cáncer de mama ER+.....	31
3.8. Terapéutica del Cáncer de mama ER+ .....	32
3.8.1. Modalidades de terapia endocrina en cáncer de mama ER+ .....	33
3.8.2. Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERMs).....	34
3.8.2.1. Clasificación de los SERMs .....	36
3.8.2.2. Tamoxifeno .....	37
3.8.2.3. Otros SERMs.....	39
3.8.3. Degradadores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERDs) .....	39
3.8.3.1. ICI 182,780 (Fulvestrant) .....	40
3.8.3.2. Otros SERDs .....	42
3.8.4. Inhibidores de Aromatasa (AIs).....	42
3.8.5. Resistencia a terapia hormonal en cáncer de mama ER+ .....	43

3.8.6.	Búsqueda de SERMs/SERDs con propiedades óptimas .....	46
4.	<b>Descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos</b> .....	47
4.1.	Evolución histórica y fases en el descubrimiento de fármacos.....	47
4.2.	Estrategias de cribado de potenciales fármacos.....	50
4.3.	Construcción de librerías químicas bioinspiradas en productos naturales.....	52
<b>II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS</b> .....		<b>55</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....		<b>59</b>
1.	<b>Librerías químicas (quimiotecas) de estudio</b> .....	61
1.1.	Síntesis y caracterización de librerías químicas .....	61
1.2.	Derivados de la embelina con núcleos de pirazol (PMA-Px) o acridina (PMA-Acx) .....	61
1.3.	Compuestos espirodímeros (SPx).....	64
1.4.	Compuestos basados en complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx).....	65
1.5.	Compuestos análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx) .....	67
1.6.	Compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridinona (Pym-1).....	69
1.7.	Compuestos de tipo antraquinonas (PCKx).....	71
1.8.	Compuestos análogos simplificados de la marmicina A (MARx).....	72
1.9.	Compuestos derivados de la piritildiona (Rx-Pyr) .....	73
1.10.	Compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx).....	74
1.11.	Compuestos derivados de lignanos (LGx).....	75
1.12.	Pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx).....	76
1.12.1.	Compuestos líderes seleccionados de la serie PLRx .....	80
2.	<b>Cultivos celulares</b> .....	81
2.1	Líneas celulares comerciales .....	81
2.2	Aislamiento y cultivo de células PBMC.....	83
2.3	Cultivo de células MCF-10A.....	84
3.	<b>Fármacos comerciales usados como controles</b> .....	84
4.	<b>Anticuerpos</b> .....	85
5.	<b>Cribado farmacológico de librerías químicas</b> .....	86
6.	<b>Ensayos de viabilidad celular</b> .....	86
6.1.	Ensayo de reducción metabólica del MTT .....	86
6.2.	Ensayos de wash-out .....	87
7.	<b>Ensayos de Luciferasa con genes reporteros</b> .....	88
7.1.	Ensayos en células T47D-KBluc.....	89
7.2.	Ensayos en células HEK293.....	91
7.3.	Ensayos en células Ba/F3 .....	92
7.4.	Ensayos en células MDA-kb2 .....	92

8.	<i>Estudios computacionales o in silico</i> .....	93
8.1.	Estudios de Modelado Molecular.....	94
8.2.	Estudios ADME.....	94
9.	<i>Ensayos de proliferación</i> .....	95
9.1.	Ensayos de proliferación en xCelligence.....	95
9.2.	Ensayos de proliferación en Incucyte™ HD ZOOM e Incucyte™ SX5.....	96
9.2.1.	Ensayos de proliferación en medio desprovisto de estrógenos.....	97
10.	<i>Ensayos de Afinidad-Binding</i> .....	98
11.	<i>Ensayos para el estudio de la actividad enzimática fosfatasa alcalina</i> .....	100
12.	<i>Ensayos para análisis de expresión de ARNm por PCR cuantitativa a tiempo real</i> .....	101
13.	<i>Ensayos de inmunodetección de proteínas por Western-blot</i> .....	102
14.	<i>Ensayos para la evaluación del ciclo celular y de fenómenos de apoptosis</i> .....	103
14.1.	Ciclo Celular.....	103
14.1.	Apoptosis.....	103
15.	<i>Ensayos de inmunofluorescencia por Microscopía Confocal</i> .....	104
16.	<i>Ensayos de combinación de fármacos</i> .....	105
17.	<i>Análisis matemático y estadístico</i> .....	106

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I..... 107

1.	<i>Cribado farmacológico de quimiotecas</i> .....	110
1.1.	Derivados de la embelina con núcleos de pirazol (PMA-Px) o acridina (PMA-Acx).....	110
1.2.	Compuestos espirodímeros (SPx).....	115
1.3.	Compuestos basados en complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx).....	117
1.4.	Compuestos análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx).....	120
1.5.	Compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridinona (Pym-1).....	125
1.6.	Compuestos tipo antraquinonas (PCKx).....	128
1.7.	Compuestos análogos simplificados de la marmicina A (MARx).....	130
1.8.	Compuestos derivados de la piritildiona (Rx-Pyr).....	131
1.9.	Compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx).....	132
1.9.1.	Cribado farmacológico mixto.....	132
1.9.2.	Compuestos líderes de la serie PSx.....	138
1.9.2.1.	Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta.....	139
1.9.2.2.	Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo.....	140
1.9.2.3.	Ensayos de luciferasa en células MDA-kb2.....	140
1.9.2.4.	Ensayos de unión o <i>binding</i> al ER $\alpha$ .....	141
1.9.2.5.	Perfil ADME.....	142
1.10.	Compuestos derivados de lignanos (LGx).....	144
1.10.1.	Cribado farmacológico mixto.....	144
1.10.2.	Compuestos líderes de la serie LGx.....	147
1.10.2.1.	Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta.....	147

1.10.2.2.	Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo .....	149
1.10.2.3.	Ensayos de luciferasa en células MDA-kb2 .....	150
1.10.2.4.	Ensayos de unión o <i>binding</i> al ER $\alpha$ .....	151
1.10.2.5.	Perfil ADME .....	152
1.11.	Pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx).....	153
1.11.1.	Cribado farmacológico mixto: PDD y TDD .....	154
1.11.1.1.	Cribado farmacológico PDD .....	154
1.11.1.2.	Cribado farmacológico TDD.....	157
1.11.2.	Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta .....	159
1.11.3.	Estudio de <i>docking</i> molecular .....	162
1.11.4.	Primera selección de compuestos PLRx líderes.....	164
1.11.4.1.	Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo .....	164
1.11.4.2.	Estudios de inhibición de la viabilidad celular en medio estrogénico completo	165
1.11.4.3.	Estudios de inhibición de la viabilidad de células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos .....	166
1.11.4.4.	Estudios de inhibición de la viabilidad de células T47D deprivadas de estrógenos .....	167
1.11.4.5.	Evaluación de la proliferación celular en medio libre de estrógenos.....	168
1.11.4.6.	Ensayos de unión o <i>binding</i> al ER $\alpha$ .....	170
1.11.4.7.	Perfil ADME .....	172
<b>IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II .....</b>		<b>175</b>
1.	<b><i>Elección definitiva de productos líderes: PLR-56 y PLR-67</i></b> .....	<b>178</b>
2.	<b><i>Ensayos de viabilidad en células de cáncer de mama ER+</i></b> .....	<b>178</b>
2.1.	Ensayos de viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento .....	178
2.2.	Ensayos de viabilidad celular con <i>wash-out</i> .....	179
2.3.	Ensayos de viabilidad celular en modelos no tumorales .....	181
3.	<b><i>Experimentos de proliferación en células de cáncer de mama ER+</i></b> .....	<b>182</b>
3.1.	Ensayos en cultivos 2D en medio completo .....	182
3.2.	Ensayos en cultivos 3D en medio completo .....	185
3.3.	Ensayos en cultivos 2D en medio desprovisto de estrógenos.....	187
4.	<b><i>Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente del ER<math>\alpha</math></i></b> .....	<b>189</b>
5.	<b><i>Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente de los AR y GR</i></b> ....	<b>190</b>
6.	<b><i>Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente de STAT3 y STAT5</i></b> ... .....	<b>191</b>
7.	<b><i>Experimentos para el estudio del ciclo celular en células de cáncer de mama ER+</i></b> .....	<b>192</b>
8.	<b><i>Experimentos para el estudio de la apoptosis en células de cáncer de mama ER+</i></b> .....	<b>194</b>
9.	<b><i>Regulación de la expresión proteica de ER<math>\alpha</math> en células de cáncer de mama ER+</i></b> .....	<b>197</b>
9.1.	Evaluación de la expresión proteica de ER $\alpha$ en experimentos de <i>Western blot</i> .....	197

9.2. Evaluación de la expresión proteica de ER $\alpha$ en experimentos de Microscopía Confocal ....	201
10. <i>Regulación de la expresión de genes dependientes del ER en células de cáncer de mama ER+</i>	203
11. <i>Experimentos de validación de los PLRx líderes en células de cáncer de endometrio ER+</i>	205
11.1. Ensayos de viabilidad celular en células de cáncer de endometrio ER+	205
11.2. Ensayos de proliferación en células de cáncer de endometrio ER+	205
11.2.1. Ensayos de proliferación en medio completo.....	205
11.2.2. Ensayos de proliferación en medio desprovisto de estrógenos .....	206
11.3. Evaluación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina en células de cáncer de endometrio ER+	207
11.4. Regulación de la expresión de genes dependientes del ER en células de cáncer de endometrio ER+	209
12. <i>Ensayos de combinación PLRx – 4-OHT en células de cáncer de mama ER+ y células de mama sanas</i> .....	212
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	<b>215</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	<b>237</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>243</b>
<b>VIII. ANEXO I. FINANCIACIÓN</b> .....	<b>261</b>
<b>IX. ANEXO II. CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>267</b>





# I. INTRODUCCIÓN

---



### 1. Cáncer

#### 1.1. Definición y generalidades

El cáncer se define como una proliferación y división descontrolada de células, que son capaces de llevar al límite el célebre "*omnis cellula e cellula*" establecido por Rudolf Virchow en 1858 en su libro "*Cellular Pathology*" (1). Se trata de una enfermedad de elevado impacto global, cuya morbi-mortalidad la sitúa como la primera y segunda causa de muerte en el mundo y nuestro país, respectivamente, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2,3). La estimación del número de personas diagnosticadas con cáncer a nivel global asciende a más de 19,3 millones de casos, con 10 millones de muertes en el año 2020 (4). A pesar de los grandes avances que se han producido en su tratamiento en los últimos años, la investigación sigue siendo imprescindible para superar los desafíos que se siguen planteando en la actualidad. La falta de eficacia y selectividad, la elevada toxicidad y/o la aparición de resistencias a los fármacos antitumorales suponen, entre otras, importantes limitaciones de los tratamientos actuales (5). La evolución en el conocimiento y los conceptos moleculares y celulares que rigen la biología tumoral ha facilitado un mejor entendimiento del comportamiento de muchos tipos de cáncer, aportando nuevas dianas y estrategias terapéuticas para su abordaje clínico.

#### 1.2. Características identitarias del Cáncer

El conocimiento de la biología del cáncer recibió un impulso histórico desde la publicación de las señas de identidad tumoral ("*hallmarks*") (6). La creciente información en el ámbito de la inmunomodulación o el microambiente tumoral ha permitido la revisión y actualización de estos "*hallmarks*" del cáncer, identificando siete grandes señas de identidad de la enfermedad (7,8). A estas características podrían sumarse cuatro nuevas propuestas basadas en el extensivo estudio de la literatura existente acerca de la investigación del cáncer (9):

- 1) Mantenimiento de la inmortalidad en la replicación con una señalización proliferativa selectiva, ventajosa y resistente a la muerte celular.
- 2) Alteración de la respuesta al estrés.
- 3) Vascularización y angiogénesis.
- 4) Invasión y metástasis.
- 5) Reprogramación metabólica.
- 6) Inmunomodulación y evasión de la respuesta inmune.
- 7) Evolución del microambiente celular y tisular.
- 8) Desregulación epigenética.
- 9) Desdiferenciación y transdiferenciación celular.
- 10) Alteración del microbioma.
- 11) Alteración en la señalización neuronal.

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer implica una disregulación de la maquinaria molecular de funcionamiento de las células en términos de proliferación, diferenciación y muerte celular. El proceso oncogénico se divide en múltiples pasos, que involucran cambios en la matriz extracelular, seguidos de la transformación secuencial de células normales a células cancerosas y la adaptación de estas últimas a tejidos distantes del entorno tumoral inicial (6).

En general, la formación de tumores se produce por la existencia de mutaciones, que generan inestabilidad genómica y retroalimentan la adquisición de nuevas mutaciones. En el proceso, los mecanismos de reparación de daños pueden dejar de funcionar y se produce un desequilibrio en la expresión de oncogenes y supresores tumorales. La proliferación descontrolada y los mecanismos que permiten mantener su señalización están implícitos en la definición de cáncer. Las investigaciones de los últimos años han revelado el papel fundamental de las células madre cancerosas en el proceso que gobierna el desarrollo de tumores, su reincidencia o la resistencia a tratamientos convencionales. Otra de las características que presentan todos los cánceres, es su capacidad para asegurar una respuesta adaptada al estrés, que garantice su propagación y supervivencia. De esta forma, la hipoxia o la ausencia de nutrientes hace que los tumores requieran de un aporte extra de sangre, constituyendo este otro de los puntos de control que rigen la oncogénesis. En este sentido, la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) facilita y promueve la habilidad para invadir tejidos circundantes (invasión) y dirigirse a otros tejidos (metástasis) (6–8). Otro de los rasgos característicos de los tumores es la reprogramación metabólica. Las células cancerosas son capaces de alterar la expresión de genes, que permiten incrementar la actividad de ciertas rutas metabólicas como la glicólisis, el ciclo de Krebs o la captación de aminoácidos y glucosa (7). Adicionalmente, la ruta de señalización que media la síntesis del colesterol está hiperactivada en numerosos tipos de cáncer y es una de las principales vías implicadas en los cambios metabólicos que garantizan la supervivencia de los tumores (10). Las células tumorales se adaptan, de este modo, a condiciones de baja perfusión, privación de nutrientes y alta acidificación, lo que conlleva la selección de clones más resistentes y mayor potencial metastásico (11). Por otro lado, el sistema inmune juega un rol crucial en el balance homeostático del organismo. Su papel principal en condiciones cancerosas es la erradicación de las células transformadas. Sin embargo, las células tumorales disponen de sofisticados mecanismos para evadir, alterar o boicotear la respuesta inmunológica (6).

Todos los "*hallmarks*" no funcionarían correctamente sin la continua comunicación y soporte otorgado por el microambiente tumoral. Las células tumorales no crecen de forma aislada, sino que necesitan la ayuda de las células estromales (fundamentalmente fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias), moléculas secretadas y vasos sanguíneos para cada una de las etapas de la carcinogénesis. Elementos como los fibroblastos asociados a tumores juegan un importante papel en el mantenimiento energético de estos a través de la respiración mitocondrial y facilitan fenómenos de multiresistencia a terapia endocrina (11). A todo ello, se suma la

## I. INTRODUCCIÓN

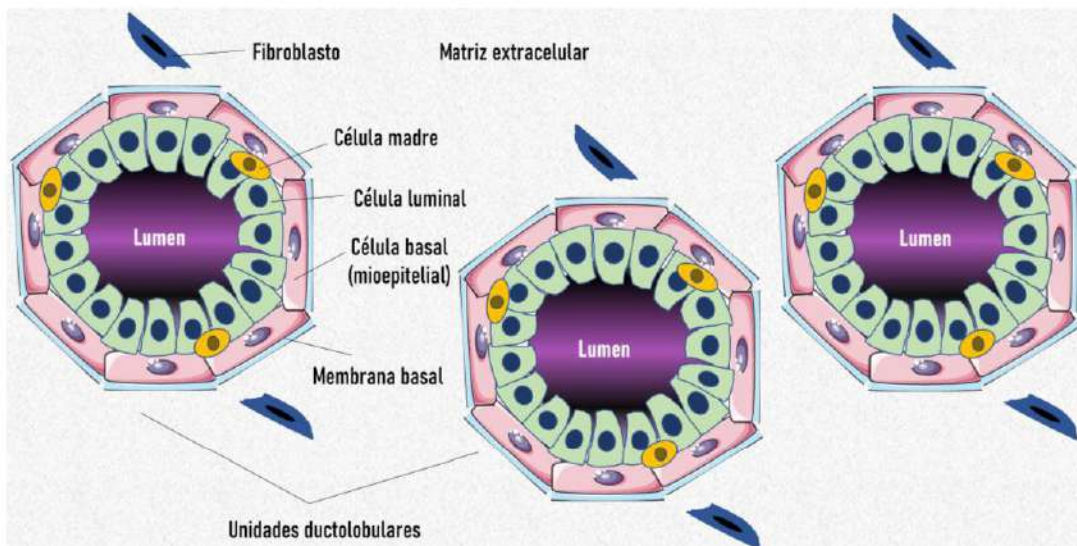
creciente complejidad en el entendimiento de la biología de los tumores, donde las células adoptan mecanismos de desdiferenciación y transdiferenciación que favorecen una gran plasticidad tumoral. La inestabilidad epigenética y genética cooperan en el recorrido a la carcinogénesis, dónde numerosas evidencias apuntan a la importancia que el microbioma y la alteración neuronal también tienen en este proceso (9).

La concepción de los rasgos del cáncer ha cambiado y lo seguirá haciendo con el paso de los años (6,8). Esto implica que se deba actualizar constantemente la información disponible con el fin de comprender cómo funciona esta patología en todos sus aspectos, así como identificar nuevas dianas y estrategias terapéuticas eficaces.

## 2. Cáncer de mama

### 2.1. Generalidades

El cáncer de mama es un crecimiento descontrolado de células de la mama. Constituye una enfermedad altamente heterogénea, de etiología molecular compleja, que engloba tumores de características histológicas, clínicas, transcurso de la enfermedad, respuesta a tratamientos específicos, patrones de diseminación y pronóstico muy diferentes (12,13). Todos los cánceres de mama tienen su origen en las unidades funcionales ductolobulares de la mama, que están formadas por un lóbulo glandular y su correspondiente conducto terminal extralobular. A nivel histológico, cada lóbulo y conducto se encuentra delineado por una monocapa de células epiteliales luminales, circundadas transversalmente por células basales (mioepiteliales) y células madre intermedias, acompañadas por tejido estromal (**Figura 1**) (12).



**Figura 1. Representación esquemática de la arquitectura histológica de una sección de mama normal y su estroma.** Ilustración de elaboración propia, adaptada de (12). La base artística para su diseño parte de la web de ilustraciones médicas (<https://smart.servier.com>).

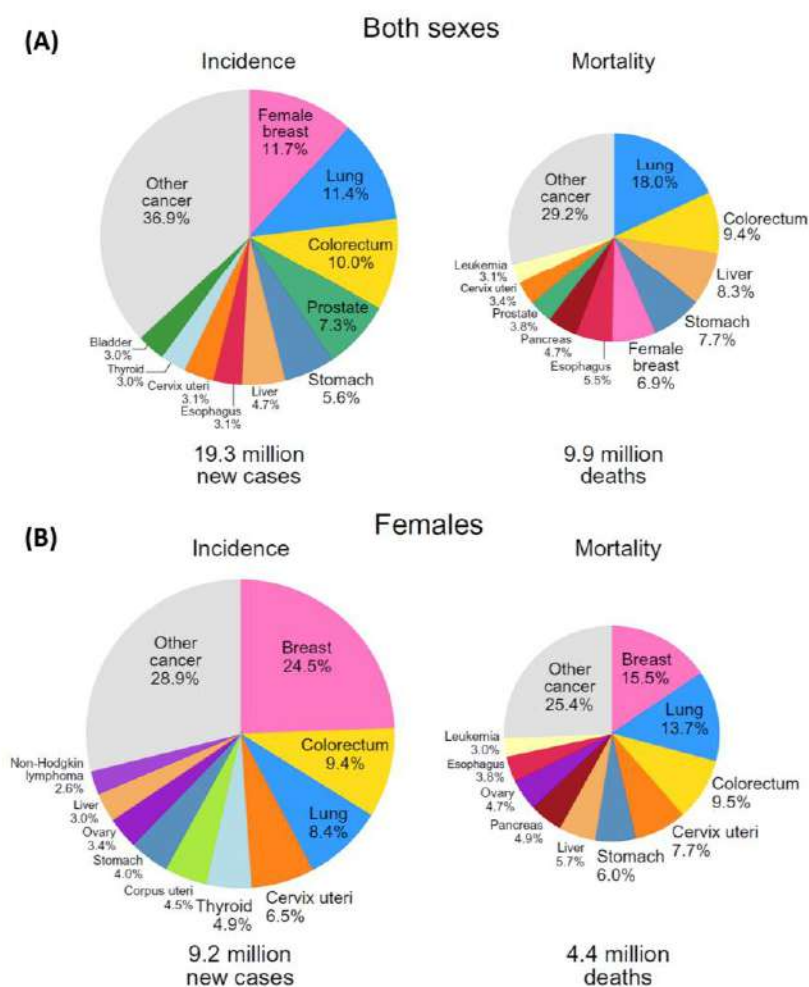


## I. INTRODUCCIÓN

Los tumores mamarios conforman la patología tumoral más frecuente en mujeres a nivel global y su tratamiento clínico tiene éxito en un 70-80 % de los casos sin metástasis y diagnóstico temprano. Las estrategias terapéuticas difieren en función del tipo de cáncer de mama, requiriendo un enfoque multidisciplinar que combine cirugía, radiación y terapia sistémica (14).

### 2.2. Epidemiología

La incidencia global del cáncer de mama sigue una tendencia de incremento anual del 3,1 %, con un primer registro de 641.000 casos en el año 1980 (14). En la actualidad, esta neoplasia ya ha logrado sobrepasar al cáncer de pulmón como el tipo de cáncer de mayor incidencia a nivel mundial, según los datos publicados por Globocan en el año 2020 (4). Se estima que cerca de 2,3 millones de personas han sido diagnosticadas como nuevos casos anuales y constituye la quinta mayor causa de número de muertes por cáncer (685.000) a nivel mundial (4). Resulta, además, el principal diagnóstico clínico en mujeres, siendo también la primera causa de muerte en este grupo en 110 países, incluyendo España (3,4,15) (**Figura 2**).



**Figura 2. Incidencia y mortalidad del top 10 mundial de tipos de cáncer más comunes en (A) los dos sexos y (B) en mujeres. Ilustración tomada de Globocan 2020 (4).**

## I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama afecta, principalmente, a mujeres, siendo en hombres una enfermedad muy poco frecuente. Del total de casos de cáncer de mama, menos del 1 % afectan al sexo masculino, atribuyéndose a esta enfermedad menos de un 0,5 % de las muertes en dicho sexo (14).

Existe una enorme desigualdad a la hora de realizar un diagnóstico temprano del cáncer de mama entre diferentes países. Aquellos con altos ingresos, aunque muestran tasas de incidencia mayor, realizan un diagnóstico precoz. Esto favorece un mejor pronóstico y un rápido acceso a tratamiento, frente a aquellos países de renta baja en los que se hace un diagnóstico más tardío de la enfermedad. Este factor repercute negativamente en las estadísticas de mortalidad. Otros condicionantes epidemiológicos vienen definidos por el estilo de vida, razones culturales y ambientales, la etnia o la predisposición genética del individuo. Con respecto a esta última variable, cabe decir que, según las estadísticas, aproximadamente el 10 % de los cánceres mamarios son hereditarios y dependientes de la historia familiar (14).

### 2.2. Clasificación del cáncer de mama

Históricamente, desde el enfoque de la patología clásica, la identificación y clasificación de los tumores mamarios se ha regido por criterios histopatológicos: edad del paciente, grado histológico del tumor, tamaño, presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (*status*) y grado de expresión de receptores de estrógeno (ER) / receptores de progesterona (PR), relacionándose todo ello con el pronóstico clínico (16,17). Esto ha permitido diferenciar dos grandes grupos de tumores mamarios: el cáncer de mama *in situ* o no invasivo (20 % de los casos) y el cáncer de mama invasivo (80 % de los casos). Dentro del primer grupo, se distinguen los carcinomas ductales *in situ* (DCIS, que suponen el 80 % del total de casos no invasivos) y los carcinomas lobulares *in situ* (LCIS, 20 % de los casos). Con el paso del tiempo y el empeoramiento clínico, muchos de los DCIS y LCIS pueden progresar a carcinomas mamarios invasivos ductales (IDC, 75 %) y lobulares (ILC, 25%), respectivamente, que presentan la capacidad de diseminarse a otros órganos y generar metástasis (11). La casuística respecto a esta taxonomía del cáncer de mama puede seguir complicándose. La OMS distingue en su clasificación más de 20 subtipos histológicos diferentes (18).

Otra manera de clasificar el cáncer de mama es en función de sus características inmunopatológicas. Según esta categorización, inicialmente los tumores se dividían en aquellos con expresión positiva para el ER (ER+) y aquellos con expresión negativa (ER-) (19). Posteriormente, se establecieron subtipos de acuerdo con los patrones de expresión inmunohistoquímica del ER, el PR (20), el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2/Neu ó ERBB2), o la ausencia de todos ellos (cáncer de mama triple negativo, abreviado como TNBC por sus siglas en inglés *Triple Negative Breast Cancer*) (12). Los tumores con

## I. INTRODUCCIÓN

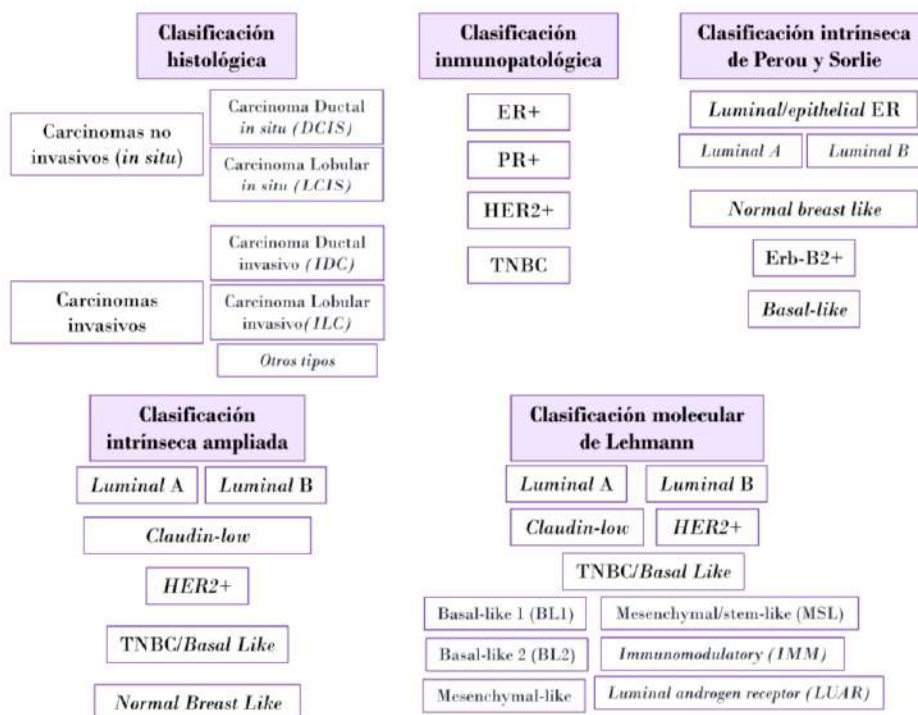
expresión positiva para el ER (ER+), PR (PR+) o ambos (ER+/PR+) comprenden aproximadamente el 70 % de los tumores mamarios (21) y reciben el nombre de cánceres de mama dependientes de hormonas. Los tumores con expresión positiva de HER2 (HER2+) suponen el 15-20 % (22,23), mientras que los tumores TNBC representan el 10-20 % de los casos totales (24,25). La expresión de los citados receptores se ha usado desde entonces en combinación con el marcador molecular Ki-67 para definir las opciones terapéuticas de los pacientes afectados, la agresividad del cáncer y el pronóstico clínico (11,26). El tipo de cáncer de mama identificado en un paciente condiciona por tanto su terapéutica. A modo de síntesis, el cáncer de mama ER+ se trata principalmente con terapia endocrina (hormonoterapia), los HER2+ con anticuerpos específicos como trastuzumab, mientras que los tumores TNBC se tratan con quimioterapia antineoplásica convencional no selectiva (19).

Los avances en el estudio del cáncer de mama basados en la combinación de diferentes criterios (histológicos, inmunopatológicos y moleculares) ha permitido establecer otras clasificaciones. De este modo, la llamada clasificación intrínseca de Perou y Sorlie publicada en el año 2000 (24) se basa en el patrón de expresión de 496 genes “intrínsecos” agrupados jerárquicamente y modifica el manejo clínico del cáncer de mama al pasar de una visión basada en las características de la masa tumoral a un enfoque centrado en aspectos de la biología molecular del cáncer. Estos autores establecen cuatro subtipos de cáncer de mama: *luminal epithelial/ER+*, *basal-like (ER-)*, *Erb-B2+* y *normal-breast-like*. Posteriormente, se profundiza en la creación de otros subgrupos introduciendo variables como la tasa de proliferación, la capacidad metastásica, expresión génica, así como fenotipo y genotipo metabólico. Esto lleva a diferenciar los tumores de mama en luminal A, luminal B, *claudin-low*, HER2+, TNBC/*basal-like* y *normal-breast like* (13,27,28). Esta clasificación no resolvía totalmente el marco en el que se definía el cáncer TNBC, al quedar repartido en los subgrupos *claudin-low* y *basal-like*, que recoge el 80% de estos tumores (11). La clasificación molecular de Lehmann y colaboradores define subtipos de cáncer de mama TNBC en función del grado y fase del tumor, la presencia de determinados productos génicos y la expresión de ciertas proteínas (13,25,29,30), construyendo un marco de clasificación más preciso y amplio para la totalidad de cánceres de mama, que distingue seis subtipos moleculares de cáncer de mama TNBC: *basal-like 1 (BL1)*, *basal-like 2 (BL2)*, *mesenchymal-like (M)*, *mesenchymal/stem-like (MSL)*, *immunomodulatory (IMM)* y *luminal androgen receptor (LUAR)* (25).

Existe una creciente complejidad en la taxonomía del cáncer de mama, atendiendo a diferentes factores (11,31). La clasificación de los distintos tipos puede efectuarse en función de sus características clínicas, la expresión de marcadores tumorales, el tipo histológico o la expresión de ciertos productos génicos y metabólicos (**Figura 3**). Sin embargo, su clasificación más frecuentemente utilizada se refiere a su fenotipo según sus características de expresión inmunohistoquímica (12,20).



## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 3. Representación esquemática de la clasificación del cáncer de mama.** División del cáncer de mama en subtipos, en función de diferentes criterios: histológico, inmunopatológico o molecular (12,13,24,25). Esquema de elaboración propia.

### 3. Cáncer de mama estrógeno positivo (ER+)

#### 3.1. Tipos de cáncer de mama estrógeno positivo (ER+)

El cáncer de mama ER+ engloba al 60-70 % de los cánceres de mama (21,30), incluyendo tumores ER+ (16 % de los casos), PR+ (8,9 % de los casos) y ER+/PR+ (75 % de los casos) (32,33). El criterio histológico para considerar un cáncer de mama ER+ establece la presencia de tumores con más de un 1 % de células inmunorreactivas a los ER y PR (20). La inclusión de otros criterios de división tales como las diferencias intrínsecas en la expresión génica o las diferencias macro- y microambientales de cada contexto maligno permiten revelar diferente pronóstico clínico. En general, tumores con presencia de receptores hormonales ER+ y PR+ evidencian un mejor pronóstico clínico que los tumores HER2+ y, estos, mejor que los tumores TNBC (12).

La creación de perfiles de expresión génica ha permitido diferenciar dos principales subtipos de cáncer ER+: luminal A y luminal B (13,30). Aunque comparten características biológicas similares, difieren en el grado de inestabilidad genómica, la actividad proliferativa, y la expresión de ER y genes ER dependientes. Los cánceres ER+ luminales tipo A (con una frecuencia del 50-60%) incluyen a aquellos con expresión positiva del ER+ y/o de PR+, una baja expresión de Ki-67 y bajo grado histológico. Por su parte, las neoplasias luminales tipo B incluyen a aquellos tumores ER+ y/o PR+ y, a veces, HER2+. Estos últimos (con una frecuencia del 10-20%) presentan mayor inestabilidad genómica, grado histológico intermedio-alto, menor nivel de

## I. INTRODUCCIÓN

expresión de ER y mayor nivel de expresión de genes implicados en la proliferación (alta expresión de Ki-67) con respecto al tipo luminal A (19). Tienen, por todo ello, un peor pronóstico clínico y respuesta frente a agentes endocrinos (11,30). El PR es una diana transcripcional del ER, considerándose, por tanto, un marcador de señalización intracelular mediada por el mismo. La expresión de ambos receptores permite medir la dependencia hormonal de los tumores en muestras clínicas. Además, esto permite la selección de pacientes para el tratamiento anti-hormonal (34). La expresión de los distintos receptores hace que la supervivencia, crecimiento y proliferación de estos tumores dependa íntimamente de ellos, de su interacción con hormonas y de las respuestas celulares y tisulares desencadenadas (19).

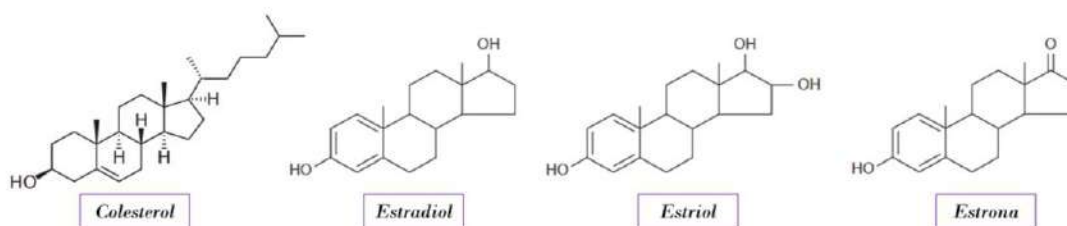
El cáncer de mama, como cualquier otro tipo de cáncer, se origina en su amplia mayoría por la aparición de mutaciones de células somáticas, como consecuencia de la aparición de eventos estocásticos en la maquinaria de edición o reparación del ADN y ante la exposición de mutágenos (35). Uno de los mayores factores de riesgo asociados a la aparición de cáncer de mama reside en la exposición a hormonas estrogénicas. Estas gobiernan el desarrollo mamario normal durante la pubertad, los ciclos menstruales y el embarazo. Las fluctuaciones en los niveles de estrógenos y progesterona conllevan cambios en la proliferación, pudiendo desencadenar mutaciones en las células mamarias y una división descontrolada de las mismas, donde los ER adquieren un papel protagonista (14). De todos los tumores de mama ER+, una pequeña proporción puede deberse a alteraciones genómicas hereditarias, y sólo un 1 % de los casos presentan mutaciones en los ER. Esta frecuencia de mutación puede verse alterada conforme se incrementa la malignidad del tumor y se adquiere resistencia a la hormonoterapia, incrementándose las mutaciones en los ER hasta más del 33 % (35).

### **3.2. Descripción y relevancia fisiológica de los estrógenos y sus receptores**

Los estrógenos son hormonas esteroideas que cumplen funciones cruciales para el desarrollo normal, los procesos fisiológicos y reproductivos de los vertebrados (36). Cumplen con un espectro de funciones que va desde la regulación del ciclo menstrual, el desarrollo normal de la mama y el mantenimiento de los órganos reproductivos, a la modulación de la densidad ósea, hígado, función cerebral, la homeostasis del sistema nervioso central (SNC), cardiovascular, esquelético, inmune e incluso la movilización del colesterol o su papel en la prevención de la osteoporosis (37–39). Es tal su importancia en procesos fisiológicos no reproductivos que, incluso invertebrados con reproducción asexual, también presentan proteínas similares a los estrógenos y ERs que regulan sus procesos metabólicos (11). Además de los estrógenos de origen humano, existen también compuestos estrogénicos no esteroideos derivados de plantas (fitoestrógenos) y hongos (micoestrógenos) con repercusión sobre la fisiología humana y la de otros animales. Del mismo modo, los estrógenos admiten una clasificación en función de su origen natural o sintético,

## I. INTRODUCCIÓN

encontrando en el último de los grupos a los denominados disruptores endocrinos. Existe una creciente preocupación mundial por la interferencia que estos compuestos estrogénicos pueden generar sobre la función endocrina normal, el desarrollo y la fertilidad (40,41). Los estrógenos esteroideos de origen natural, cuyo grupo viene representado fundamentalmente por la estrona, el estradiol (E2) y el estriol, son moléculas lipofílicas derivadas del colesterol (**Figura 4**) (42). Presentan una unidad química estructural conocida como ciclopentanoperhidrofenantreno, conformada por 18 átomos de carbono (43). Esta estructura se caracteriza por la unión de cuatro anillos: un anillo fenólico con un grupo hidroxilo unido al C3, dos ciclohexanos y un ciclopentano.



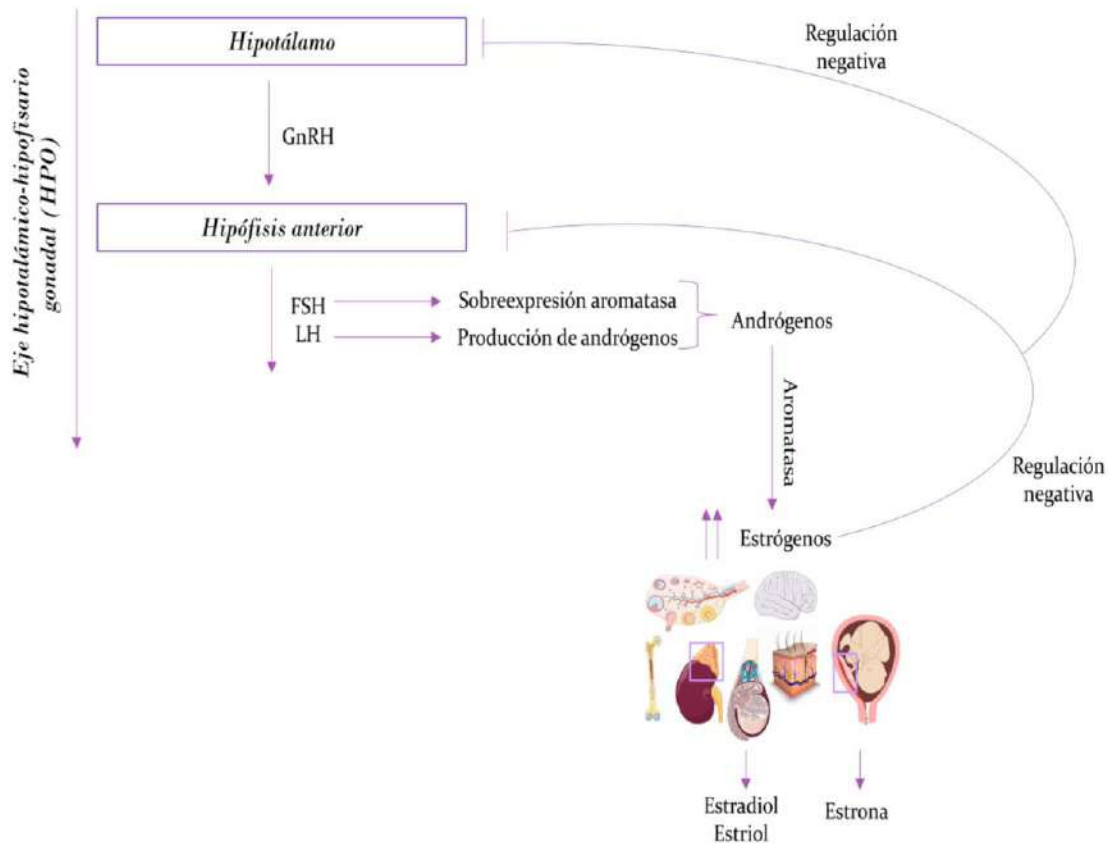
**Figura 4.** Estructura química del colesterol y los principales estrógenos naturales. Adaptado de (44).

Los estrógenos son liberados por la corteza suprarrenal, los testículos, los ovarios y la placenta, tanto en humanos como en animales (43). Una vez producidos, se dirigen a sus tejidos diana, difundiendo pasivamente a través de la membrana plasmática de las células involucradas para regular eventos tisulares específicos (42). Son sintetizados por la catálisis enzimática de los andrógenos en un proceso dirigido por la aromatasa, cuya expresión viene regulada por el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG) a través de la producción de las gonadotropinas (hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH)). La LH induce la producción de andrógenos y la FSH la de la aromatasa, favoreciendo la conversión de los andrógenos en estrógenos (39,45) (**Figura 5**).

A nivel celular, los estrógenos están involucrados en procesos de crecimiento, supervivencia, diferenciación o metabolismo (11,39). A pesar de sus efectos beneficiosos sobre la fisiología normal, el comportamiento aberrante de estas hormonas está relacionado con la patogenia de enfermedades como cáncer, osteoporosis, problemas cardiovasculares, desórdenes metabólicos o enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (46). Especialmente, la desregulación de la ruta de los estrógenos está estrechamente asociada con el progreso de distintos tipos de cáncer, incluyendo mama, endometrio, ovario, próstata, colon y pulmón (39,47). Muchas de las funciones de los estrógenos se orquestan a través de la activación de los ER alpha ( $ER\alpha$ ) y betha ( $ER\beta$ ), modulando con ello la transcripción de sus genes diana y la mayor parte de sus efectos genómicos (48,49). Otras funciones de los estrógenos son mediadas a través de respuestas celulares no genómicas, donde los ER inducen actividades extranucleares (50) desde orgánulos como la membrana plasmática, la mitocondria o el retículo endoplasmático liso (51).



## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 5. Esquema ilustrado de la producción fisiológica de estrógenos.** Los estrógenos naturales se producen a partir de la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG), que comienza con la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH, sobre la hipófisis anterior. En respuesta a ello, esta produce la hormona foliculostimulante (FSH), que incrementa la expresión de la aromatasa y la hormona luteinizante (LH), que estimula la producción de andrógenos. La aromatasa cataliza la aromatización de andrógenos en estrógenos en ovarios, corteza adrenal, testículos, cerebro, hueso y piel. El estradiol (E2) es el tipo de estrógeno liberado fundamentalmente por ovarios, corteza adrenal y testículos, mientras que la estrona es producida en la placenta durante el embarazo (39). Esquema de elaboración propia con la base artística de la web de ilustraciones médicas (<https://smart.servier.com>).

En las últimas décadas, numerosos estudios han puesto de manifiesto la correlación existente entre los estrógenos y los cánceres de mama, ovario, próstata, colon y pulmón (39,52). En ellos es posible asociar la señalización estrogénica a través de los ER con la inestabilidad genómica, mutaciones, evasión de la muerte celular, procesos inflamatorios, reprogramación energética, angiogénesis, invasión y metástasis (53). De hecho, tras los resultados obtenidos en el programa de investigación “*Women’s Health Initiative*”, desarrollado entre 1991 y 2002, el Programa Nacional de Toxicología de los Estados Unidos (EE. UU.) clasificó a los estrógenos como carcinógenos en una decisión sin precedentes (39). Por todo lo anteriormente comentado, en la actualidad, los ER son considerados dianas terapéuticas de gran relevancia clínica que han despertado un creciente interés en el desarrollo de nuevas entidades químicas con las que modular sus actividades.

### 3.3. Los Receptores de Estrógenos

#### 3.3.1. Generalidades

Los ER pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares humanos, constituida por un grupo de hasta 48 factores de transcripción activados por ligando (54). ER $\alpha$  y ER $\beta$  (también llamado ER $\beta$ 1) están codificados por dos genes distintos: *ESR1*, también llamado *NR3A1*, ubicado en el cromosoma 6-6q21.5; y *ESR2*, también denominado *NR3A2*, localizado en el cromosoma 14-14q23.2, respectivamente (55). El ER $\alpha$  fue descrito por primera vez en 1958, cuando Elwood Jensen y colaboradores sugirieron que los efectos estrogénicos observados en el útero podrían estar mediados por un receptor específico (55,56). Su secuencia nucleotídica de ADNc fue identificada y clonada en 1985 en los trabajos de Pierre Chambon y su equipo (57). El ER $\beta$  fue descubierto y clonado por Jan-Ake Gustafsson y su grupo en la próstata de roedores en el año 1996 (58). De forma genérica, podría decirse que los ER $\alpha$  está involucrados en la proliferación celular de tejidos reproductores (útero, mama) y metabólicos (hígado, tejido adiposo y músculo esquelético). Por su parte, los ER $\beta$  son moduladores de actividades de tejidos extra-reproductivos, particularmente cerebro, pulmón, próstata, sistemas cardiovascular y nervioso central y además, también de los ovarios (37,42).

El ligando natural de los ER es el E2, que constituye la hormona estrogénica más potente en circulación y cuya afinidad por ER $\alpha$  (Kd-0,2 nanomolar ~ 0,2 nM) es aproximadamente 10 veces mayor que para ER $\beta$  (42,59). La expresión y distribución de los ER varía de manera relativa y absoluta en función del contexto tisular. Muchos tejidos, incluyendo los tumores dependientes de estrógenos, expresan ambos tipos de ER. En ellos, la ausencia de estrógenos determina un estado inactivo de los ER, que permanecen mayoritariamente en el citoplasma y el núcleo asociados a proteínas de choque térmico denominadas chaperonas (52). Los ER funcionan como proteínas intracelulares, que actúan como factores de transcripción activados por ligando (54). Su activación se produce por la unión de estrógenos o compuestos “*estrogen-like*”, que inducen un cambio conformacional sobre los mismos, su disociación del complejo de chaperonas, su homo- o heterodimerización (ER $\alpha$ /ER $\alpha$ , ER $\beta$ /ER $\beta$  o ER $\alpha$ /ER $\beta$ ), fosforilación y su translocación al núcleo (60,61). En el núcleo, el complejo ER-ligando reconoce y se asocia a secuencias nucleotídicas específicas de corto tamaño (5'-GGTCANNNTGACCT-3'), denominadas elementos de respuesta estrogénica (ERE) (62). Las secuencias ERE están generalmente ubicadas en las regiones promotoras o regiones amplificadoras – *enhancers* – de los genes de respuesta (activación o represión) a estrógenos (54). Los complejos ER-ligando adoptan una estabilización conformacional, se anclan a los ERE desencadenando la atracción de co-activadores (SRC-1/NCoA-1, SP1 o proteína activadora, AP1) o co-represores (SMRT, NCoR) y orquestan el inicio, la intensificación o la represión de la expresión de genes dependientes de estrógenos (54). Los ligandos también pueden dirigir modificaciones postranslacionales de los ER o sus co-

reguladores, conduciendo con ello a eventos de fosforilación, ubiquitinación, sumolización o modificaciones epigenéticas (metilación, acetilación) (55). La fosforilación de ER $\alpha$  está asociada, por ejemplo, con un incremento de la actividad transcripcional al reducirse la interacción con co-represores y promover la interacción con co-activadores (38).

Existen muchas variantes en la formación de los complejos de transcripción, lo que resulta en la activación de rutas de señalización y *sets* de genes diferentes (63). En los promotores de algunos genes, especialmente en aquellos involucrados en la proliferación celular, ER $\alpha$  y ER $\beta$  pueden presentar acciones opuestas, sugiriendo que la respuesta a estrógenos es el resultado de un equilibrio entre formas de los ER y sus variantes transcripcionales (64). Además, los diferentes tipos de genes, así como su nivel de expresión, difiere también en función del contexto tisular, posibilitando funciones y efectos diferentes en los sistemas inmunológico, esquelético, cardiovascular o nervioso, y, específicamente, en órganos como hígado, útero, mama o hueso (60).

### 3.3.2. Estructura de los ER $\alpha$ y ER $\beta$

Los ER nucleares (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) muestran una estructura proteica funcional común y estructuralmente conservada a lo largo de la evolución, con una homología moderada del 44 % compartida en la secuencia global de aminoácidos. Sus estructuras están constituidas por cinco dominios estructurales: A/B; AF1; C; DBD; D, *hinge* o bisagra; E, LBD/AF2; y F (39,42,55) (**Figura 6**).

El dominio A/B es el más cercano al extremo amino terminal de la proteína y en él se incluye un espacio constitutivamente activo denominado como Función Activadora-1 (*AF-1*, *Activation Function-1*) que contribuye a la actividad transcripcional de la proteína, funcionando de manera independiente a la unión del ligando al receptor (38,55). De esta región depende la interacción con otras proteínas co-reguladoras (64). Es, además, la responsable de la mayor parte de las diferencias funcionales encontradas entre ER $\alpha$  y ER $\beta$ , lo que se explica por el 15-17 % de homología en la secuencia de ambos y que hace que sea menos activa en el ER $\beta$  respecto al ER $\alpha$  (39,42,55). Algunos datos sugieren que AF-1 en el dominio A/B del ER $\beta$  posee actividad represiva, lo que explicaría su papel diferencial respecto a ER $\alpha$  en determinados tejidos (38).

El dominio C, localizado en el centro de la proteína, constituye el dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) y presenta un alto grado de conservación entre ER $\alpha$  y ER $\beta$ , compartiendo una homología superior al 95-97 % (39). La alta homología permite que ambos ER modulen la expresión de los mismos genes (65). A nivel funcional, el dominio C permite la dimerización del ER y su unión a la secuencia palindrómica consenso “GGTCAnnnTgACC” (secuencia ERE) en los genes de respuesta a estrógenos, gracias a su estructura con una disposición de cuatro cisteínas en dos dedos de zinc (55,65).



## I. INTRODUCCIÓN

El dominio D o región de bisagra (del inglés, “*hinge*”) actúa como elemento de separación entre los dominios DBD (dominio C) y LBD (dominio D). Presenta una homología compartida del 36 % entre ambos tipos de ER (42). Facilita el transporte del ER al núcleo mediante una señal de localización nuclear que aparece en su estructura (39), así como su modificación postraduccional (66). Interviene también en la asociación de los ER y chaperonas, posibilitando una conformación transcripcionalmente inactiva de los receptores (52).

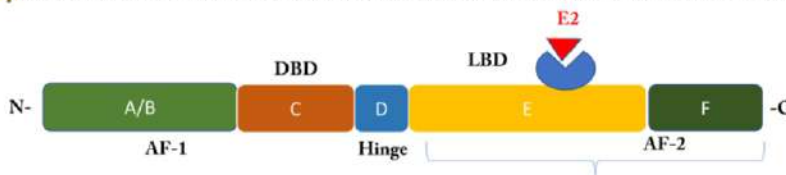
El dominio E es el referido a una región globular en la que se produce la unión del ligando (LBD, *Ligand Binding Domain*) y presenta una homología moderada del 53-56 % en las secuencias de ER $\alpha$  y ER $\beta$  (39,42). Entre el dominio LBD y el dominio F, se encuentra la otra región con actividad transcripcional, denominada Función Activadora-2 (AF-2, *Activation Function-2*) (42). Es responsable de la activación del ER dependiente de E2, contribuye también a la dimerización del receptor (65), sirve de región de unión para los co-activadores y co-represores y modula además las funciones de los dos dominios activadores AF-1 y AF-2 (55). La afinidad del LBD por el E2 es similar en ambos ER. La región AF-2 de ER $\alpha$  y ER $\beta$  presenta un alto grado de homología. La habilidad de AF-1 y AF-2 para modular la transcripción depende del contexto celular y del promotor específico del ERE modulado, así como de la capacidad de un ligando de interactuar de forma diferencial con los dominios AF-1 y AF-2, bloqueando o activando uno o ambos (38).

El dominio F está próximo al extremo carboxilo terminal y presenta una homología en la secuencia de aminoácidos del 18 % entre ambos receptores. Su función no está del todo definida, aunque se reconoce cierta modulación sobre la actividad de los ligandos de ambos ER (54,65).

**ER $\alpha$ . PM: 66-70 kDa. Gen: 300 kB. Prot: 595 aa. Localización en Chr. 6-6q21.5.**



**ER $\beta$ . PM: 60-63 kDa. Gen: 254 kB. Prot: 530 aa. Localización en Chr. 14-14q23.2.**



**Figura 6. Estructura primaria esquematizada de ER $\alpha$  y ER $\beta$ .** Ambas proteínas están conformadas por cinco dominios estructurales (A/B-F). En la ilustración se incluye la información del peso molecular (PM) de cada isoforma clásica, el tamaño del gen en kB, el tamaño de la proteína en aminoácidos y sendas localizaciones cromosómicas. Además, se establece una relación de la homología de cada región entre ambos ER. El dominio A/B, AF-1 es mucho más corto en ER $\beta$ . El dominio E, LBD constituye el lugar de unión del ligando, ejemplificado a través del E2. Adaptado de (39,65).

## I. INTRODUCCIÓN

Los estudios moleculares revelan que la posición resultante de la hélice 12 del dominio LBD en respuesta a la unión de un ligando es determinante en la función ejercida por el complejo ER-ligando (efectos agonistas o antagonistas) desencadenada en el tejido diana (54). Cuando un agonista como el E2 o el dietilestilbestrol (DES) se asocia al ER, la hélice 12 del receptor se posiciona de tal manera que completa la formación de un complejo activado y facilita las interacciones del receptor. Ello permite el reclutamiento de proteínas co-activadoras que se asocian a la superficie del dominio AF-2 del ER (54). En contrapartida, la unión de un antagonista del ER como el tamoxifeno genera una rotación en la hélice 12, ocupando la superficie de unión del dominio AF-2, lo que resulta en antagonismo transcripcional. Del mismo modo, cuando antagonistas como el ICI 182,780 (ICI) o el raloxifeno (RAL), se unen al receptor, su dominio LBD asume una conformación que impide el reconocimiento físico de los co-activadores respecto al complejo y bloquean la transcripción de genes dependientes del ER. Además, se ha demostrado que la unión de distintas clases de moléculas dan lugar a cambios conformacionales diferentes en el dominio LBD, lo que repercute finalmente en distintos patrones de reclutamiento de co-activadores y co-represores para la regulación de la expresión génica (38,54).

En resumen, las diferencias en los efectos mediados a través de los ER se explican como consecuencia del tejido diana, la diferente expresión de isoformas, los ligandos específicos del ER, la afinidad de dichos ligandos por los ER, las configuraciones tridimensionales adoptadas por un complejo ligando-ER o el reclutamiento de co-activadores y co-represores asociados a un complejo ligando-ER bajo un determinado contexto tisular (55,64,65).

### 3.3.3. Equilibrio en el nivel de expresión ER $\alpha$ /ER $\beta$ .

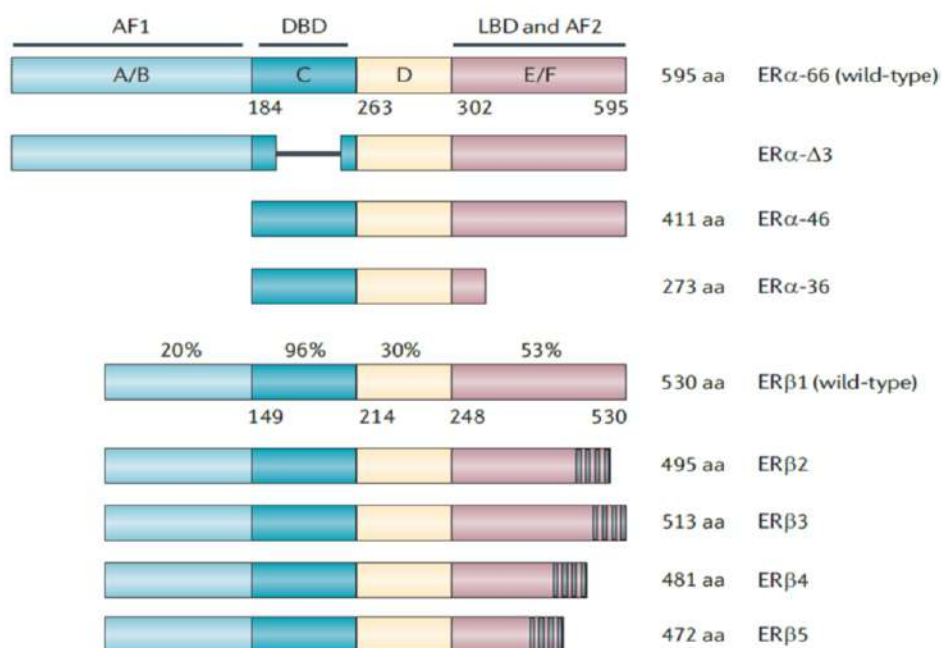
Los efectos que los compuestos “*estrogen-like*” desencadenan sobre la proliferación de células de cáncer de mama ER+ dependen también del balance entre los niveles de expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Varios trabajos señalan que el ratio en la expresión de ER $\alpha$  y ER $\beta$  es mayor en tumores mamarios que en tejidos de mama sanos (67), debiéndose este desajuste a una menor expresión de ER $\beta$ . Además, los roles entre ambas formas del ER parecen ser antagónicos (52). Algunos estudios, como el llevado a cabo por Ström y colaboradores (68), propone que cuando ambos ER están expresados en células de cáncer de mama humano (T47D), la proliferación inducida por E2 se ve parcialmente limitada con respecto a la proliferación inducida por E2 en células con expresión exclusiva del ER $\alpha$ . Esto sugeriría un papel regulador de ER $\beta$  en cáncer de mama, que actuaría además, sub-regulando la expresión del ARNm del ER $\alpha$  (68). En esta misma línea, existen evidencias que respaldan su papel supresor de tumores en distintos tipos de cáncer. Investigaciones recientes muestran que la sobre-expresión de ER $\beta$  mediante estimulación estrogénica induce efectos supresores sobre los tumores en cáncer de próstata, a través de la represión de la actividad del receptor de andrógenos (AR) y sus genes regulados (69). Todos estos



estudios resaltan la importancia del ratio ER $\alpha$ /ER $\beta$  en la proliferación celular dependiente de estrógenos (52). Este hallazgo abre la puerta a una modulación terapéutica que influya en el balance celular entre ER $\alpha$  y ER $\beta$  (39).

### 3.3.4. Isoformas de ER $\alpha$ y ER $\beta$

Otro de los factores que parece dar respuesta a los diferentes efectos desencadenados por los ER, sus ligandos y sus fármacos moduladores, se refiere no sólo a las diferencias encontradas entre ER $\alpha$  y ER $\beta$ , sino a la diferente expresión de isoformas de cada subtipo de ER (**Figura 7**). Las diferentes manifestaciones de los ER se deben a variantes de "splicing", modificaciones postranslacionales y mutaciones encontradas principalmente en los dominios AF-1 y LBD/AF-2 de ambos ER (54), que no siempre las convierten en proteínas con funciones biológicamente activas. Las diferentes variantes se han encontrado en tejidos normales y cancerosos (70). Cada ER está codificado por ocho exones (42) y el tamaño completo del ER $\alpha$  y ER $\beta$  humano es de 595 (66 kDa) y 530 aminoácidos (60 kDa), respectivamente (70).



**Figura 7. Representación esquemática de los dominios funcionales y estructurales de los ER humanos y sus principales isoformas.** En la ilustración se representan los dominios A-F referenciados con su respectivo número de aminoácidos y el porcentaje de homología en la secuencia de aminoácidos entre las formas clásicas de ambos ER. A continuación de las formas canónicas, se incluyen las isoformas más representativas de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -66, ER $\alpha$ - $\Delta$ 3, ER $\alpha$ -46 y ER $\alpha$ -36) y ER $\beta$  (ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2, ER $\beta$ 3, ER $\beta$ 4, ER $\beta$ 5). La mayor parte de estas variantes se expresan en tejidos malignos e influyen sobre la biología del cáncer. Ilustración tomada de Thomas y Gustafsson, 2011 (70).

La mayor parte de las isoformas de ER $\alpha$  son de tamaño más corto, difieren en las regiones 5' no transcritas (UTR) y carecen de algún segmento, aunque no tienen alterada su estructura primaria. Así, se distinguen, por ejemplo, dos variantes endógenas de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -36 y ER $\alpha$ -46) carentes del exón 1, que dan lugar a isoformas truncadas en sus correspondientes dominios AF-1

## I. INTRODUCCIÓN

(71) y AF-1/AF-2 (72). La isoforma ER $\alpha$ -36 presenta, además, una importante pérdida de información de los dominios E y F, al carecer de los exones 7 y 8. Actúa mediante efectos de señalización estrogénica iniciados en la membrana plasmática, pero de manera opuesta a los evocados por ER $\alpha$  y ER $\beta$  (73). ER $\alpha$ -46 es capaz de hetero-dimerizar con la isoforma canónica de 66 kDa, interfiriendo con su actividad también a través de efectos sobre la membrana plasmática (39). Además, se ha determinado que esta isoforma parece conferir resistencia al tratamiento con 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) en cáncer de mama y que promueve su acción agonista en cáncer de endometrio (70). De forma adicional, se han descrito otras isoformas de ER $\alpha$  a partir de estudios experimentales. La eliminación del exón 4 da lugar a una proteína mutante de 55 kDa (ER $\alpha$ -55 o ER $\alpha$ - $\Delta$ 3) carente de señales de localización nuclear, sin capacidad de unir ADN ni ligandos, funciones de transactivación, ni habilidad de interferir con el ER $\alpha$  clásico. La delección del exón 5, registrada en diferentes líneas tumorales de mama, origina una proteína de 52 kDa (ER $\alpha$ -52) que sí mantiene la función del DBD, pero presenta una función estéril para el LBD. También existe una variante transcripcional del exón 7, que expresa una isoforma de ER $\alpha$  presente en tejido mamario normal y que carece de las funciones de transactivación AF-1/AF-2, así como del LBD (42).

Para ER $\beta$  también se han descrito múltiples isoformas, muchas de las cuales constituyen proteínas expresadas con funciones definidas en los tejidos. Las isoformas ER $\beta$ 2 (también llamada ER $\beta$  cx), ER $\beta$ 4 y ER $\beta$ 5 surgen de fenómenos de "*splicing*" alternativo del exón 8 y tienen un conjunto de aminoácidos exclusivos que sustituyen la parte carboxilo terminal del LBD, lo que hace que no tengan capacidad de unir ligandos ni coactivadores y que vean alterada su actividad transcripcional (73). Como ocurre con otras isoformas truncadas de ER $\alpha$ , ER $\beta$ 2 es capaz de hetero-dimerizar con ER $\alpha$  e inhibir la formación del complejo transcripcional que activa genes relacionados con la progresión del ciclo celular (64,70). Algunos estudios apuntan a que la presencia de esta variante supone un cáncer de mama con fenotipo metastásico y menor probabilidad de supervivencia para quienes lo padecen (70). Otra isoforma, la ER $\beta$ 5, presenta una delección del quinto exón, lo que conlleva un cambio en su lectura molecular y una terminación de la proteína antes de la región LBD (64).

### 3.3.5. Distribución tisular y localización subcelular de los ER

ER $\alpha$  y ER $\beta$  están ampliamente expresados en muchos tejidos, pero su grado de expresión en las células diana depende del contexto tisular. ER $\alpha$  es más abundante en mama, endometrio, células teca del ovario, testículo, hipotálamo, hígado y riñón; mientras que la distribución de ER $\beta$  es más abundante en cerebro, hueso esponjoso, endotelio, corazón, intestino, pulmón, vejiga, células granulosas del ovario y tejido prostático (54,74). Ambos ER muestran tanto funciones

## I. INTRODUCCIÓN

superpuestas como opuestas en relación a su abundancia relativa y expresión variable en los tejidos (54,55).

Aunque los ER están mayoritariamente en el núcleo, presentan una múltiple distribución subcelular en los tejidos diana, localizándose en pequeños *pools* en la membrana plasmática (5-10 %), citoplasma, mitocondrias, peri-membranas y núcleos de células dependientes de estrógenos (51). Esta distribución facilita la cascada de señalización mediada por estrógenos en los procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular (42). Conviene destacar que existe un transporte dinámico bidireccional de los ER entre citoplasma y núcleo a través de nucleoporinas que conforman los complejos del poro nuclear ubicados en la membrana nuclear (75). La entrada y salida entre compartimentos requiere de fenómenos de importación o exportación nuclear en el que participan proteínas transportadoras tipo importinas y exportinas, respectivamente. Estas proteínas interactúan con unas secuencias específicas de los ER que portan señales de localización nuclear, que favorecen la movilización dinámica y median en la localización subcelular de los ER (76).

En resumen, cuando a nivel subcelular los ER se encuentran en el citoplasma unidos a chaperonas, están en estado inactivo. La unión de sus ligandos induce su activación al generar un cambio conformacional, su disociación de las proteínas de choque térmico, su dimerización, su interacción con importinas a través de las señales de localización nuclear y su translocación al núcleo. En el núcleo se produce la modulación de los genes de respuesta a estrógenos (60,61). La reducción de los ER en el núcleo se produce por la mediación de exportinas y trae consigo la reducción de la actividad transcripcional ER dependiente (76).

### 3.3.6. Receptores de estrógenos asociados a la membrana plasmática

Los ER también aparecen asociados a la membrana plasmática, donde desempeñan un papel en los efectos no genómicos mediados por la unión de estrógenos (50). Se estima que aproximadamente un 5-10 % de los ER nucleares clásicos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) están ubicados en la membrana plasmática. La translocación de estos a la membrana se efectúa vía palmitoilación de unidades de ER (50,77). Este fenómeno provoca la asociación de la caveolina-1 en el citoplasma, que actúa como proteína transportadora para reubicar a los ER en la membrana, donde se asocian junto a caveolas y otras proteínas adaptadoras para mediar una señalización no genómica rápida (51,55). En este tipo de señalización esteroidea iniciada en la membrana (*membrane-initiated steroid signaling*, MISS), los ER sometidos a palmitoilación unidos a E2 interactúan con una proteína G que activa a determinadas quinasas. Estas proteínas fosforilan a sus sustratos (canales iónicos de membrana, sistemas de segundos mensajeros, los propios ER y otras proteínas involucradas en la señalización estrogénica nuclear), dirigiendo una rápida respuesta celular que resulta en la modificación de genes de respuesta a estrógenos (42).

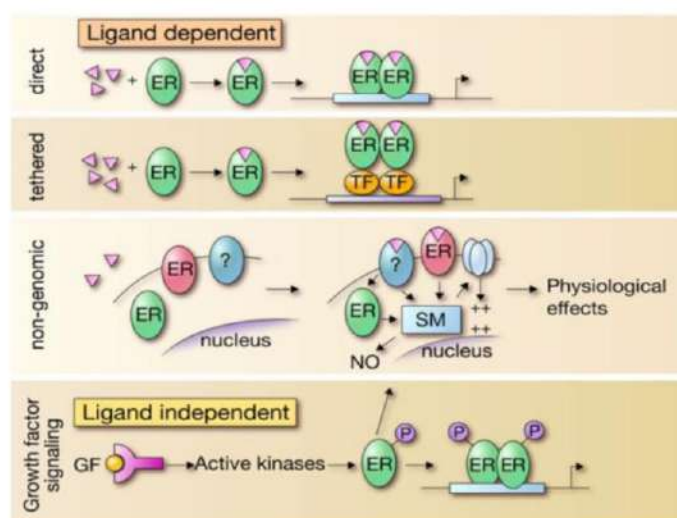


## I. INTRODUCCIÓN

Además de los ER canónicos reubicados en las membranas, existen receptores estructural- y funcionalmente independientes de los ER nucleares, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos regulan la motilidad celular, el crecimiento, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia (78). Muchos GPCRs están sobre-expresados o mutados en diversas estirpes de cáncer de mama (79). Entre ellos, el receptor estrogénico acoplado a proteína G, GPR30 (rebautizado como GPER), constituye un elemento común de la membrana citoplasmática y del retículo endoplasmático de células de cáncer de mama ER+ (73,80). Presenta una alta afinidad por el E2 y puede modular algunos de sus rápidos efectos no genómicos. GPER funciona como un ER alternativo que dirige la activación de vías de señalización diferentes y complementarias a las activadas en la ruta estrogénica clásica, como, por ejemplo, la activación de la ruta de transducción de señales vía receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)/MAPK. También se ha demostrado la existencia de una sofisticada interacción entre GPER y HER2, que promueve la proliferación de cánceres ER – (55). La interacción entre ER clásicos y GPER es fundamental para entender el complicado diálogo molecular existente en la vía de señalización gobernada por estrógenos (55).

### 3.4. Vías de señalización celular reguladas por los ER

Existen diferentes vías de señalización celular reguladas por ER, que participan en la modulación de sus procesos biológicos (64). De modo genérico, se reconocen dos vías principales: la vía de señalización que involucra a los ER y la unión de estrógenos (vía de señalización dependiente de ligando), y la vía de activación de los ER en ausencia de estrógenos (señalización independiente de ligando) (**Figura 8**). Entre ellas existe una compleja convergencia, interacción y regulación mutua.



**Figura 8. Representación esquemática de las diferentes rutas de señalización celular y mecanismos de acción moleculares regulados por los ER.** En la figura se representan la vía de señalización de los ER dependiente de ligando (genómica, *tethered* y no genómica) y la vía de señalización independiente de ligando. Ilustración tomada de (64).

### 3.4.1. Vías de señalización de los ER dependientes de ligando

Las vías de señalización de los ER dependientes de ligando requieren de la unión de estrógenos a los ER para su activación. Tiene un importante papel en las funciones fisiológicas (64), pero también juega un rol crucial en el progreso, desarrollo, crecimiento y supervivencia del cáncer de mama ER+ (55). Es responsable de la mayor parte de las señas de identidad y de los efectos biológicos de los estrógenos que aparecen en los tumores mamarios (39). Su activación puede darse en diferentes compartimentos y orgánulos celulares (membrana plasmática, mitocondria, citosol, núcleo) (42). En la señalización esteroidea iniciada en la membrana (*membrane-initiated steroid signaling*, MISS) se produce una rápida modificación de proteínas existentes y del comportamiento de las células (50), tal y como se relató en el apartado anterior. En la mitocondria, la unión ER-E2 altera la función mitocondrial al modular la expresión génica por interacción directa con el ADN mitocondrial, así como por la sobre-expresión de la enzima manganeso superóxido dismutasa (42). En la señalización estrogénica nuclear (ruta de señalización esteroidea iniciada en el núcleo, NISS), ER funciona como un factor de transcripción activado por el E2 y modula la vía mediante tres tipos de regulación: señalización dependiente de ERE (genómica), señalización no genómica y señalización “*tethered*” (39,64).

#### 3.4.1.1. Vía de señalización genómica, directa o dependiente de ERE

En la vía de señalización directa o genómica, la unión del ligando al ER genera su dimerización, activación, formación del complejo ligando-receptor, translocación al núcleo y su unión directa a secuencias nucleotídicas tipo ERE en regiones reguladoras del ADN de los genes diana, desde donde se modula la transcripción génica (39,60). En el genoma humano se han identificado más de 70.000 ERE involucrados en fenómenos biológicos relevantes tales como la proliferación o la supervivencia celular. Aunque la activación genómica de los ERE se ha estimado que ocurre tras 45 minutos de la unión del ligando al ER, este evento no sería posible sin la acción de moléculas como FOXA1, PBX1 o GATA3 que interactúan establemente con la cromatina, facilitando la accesibilidad de los ERE. Por lo tanto, las modificaciones epigenéticas de factores pioneros también modulan y son responsables de la transcripción génica en secuencias reguladoras (53).

#### 3.4.1.2. Vía de señalización por interacciones proteína-proteína, vía “*tethered*”

Esta vía de señalización se activa tras la unión del ligando al receptor y la formación del complejo, produciéndose interacciones entre proteínas y otros factores de transcripción en un proceso donde la regulación génica se ve modulada por una unión indirecta al ADN (64). A nivel mecánico, se produce la cooperación y la interacción de co-activadores (como SRC1, proteína

## I. INTRODUCCIÓN

de especificidad (SP1), proteína activadora 1 (AP1)), así como co-represores (tales como SMRT y otros factores de transcripción (factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), el supresor tumoral p53 o la proteína activadora de la transcripción y transducción 5 (STAT5)), que facilitan el papel de la ARN Polimerasa II para modular la transcripción génica en procesos de proliferación y supervivencia celular (14,39). Esta ruta es dependiente del subtipo de receptor, la naturaleza del ligando y el contexto celular (42).

### 3.4.1.3. Vía de señalización no genómica o indirecta

La vía de señalización no genómica involucra la estimulación estrogénica rápida del ER, la formación del complejo ER-E2 y la activación secuencial de complejos de transducción de señales intracelulares (53). El proceso se produce en cascadas de señalización iniciadas por segundos mensajeros que afectan a los canales iónicos o incrementan los niveles de óxido nítrico en el citoplasma, lo que lleva a una respuesta fisiológica rápida (64). Se denomina ruta no genómica, porque se inicia fuera del núcleo y es independiente de la transcripción directa de genes de respuesta a estrógenos. En esta modalidad, el complejo ER-ligando interactúa con proteínas como c-SRC, activando las vías de señalización *phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B/AKT/mammalian target of rapamycin* (PI3K–PKB/AKT/mTOR), de las *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), y de la proteína quinasa C (PKC) asociadas a la supervivencia celular. Además de ello, la ruta que involucra al ER induce efectos no genómicos basados en actividades de señalización rápida por interacción del ER citoplasmático con una importante gama de proteínas transmembranas con actividad tirosina-quinasa (81). Un ejemplo lo encontramos en la convergencia de la interacción de ER y su fosforilación mediada por EGF-EGFR. Estos diálogos moleculares son en muchos casos responsables de la aparición de resistencia a hormonoterapia con fármacos como el 4-OHT (34).

La señalización no genómica de la ruta de los estrógenos se produce también a partir de receptores estrogénicos huérfanos, localizados en la membrana y que están acoplados a proteínas G (véase apartado 3.3.6.). La activación de GPER mediante estrógenos conlleva la liberación del factor de crecimiento de unión a heparina (HB-EGF, *heparin-bound growth factor*), que promueve consecuentemente la ruta de transducción EGFR/MAPK y una cascada de activación de quinasas (78). Por otro lado, los ER pueden iniciar fenómenos de señalización no genómica mediante modificaciones postranslacionales como la fosforilación, metilación, acetilación, sumilación y ubiquitinación. Sólo en ER $\alpha$  se han encontrado hasta 22 sitios susceptibles de modificaciones. En este sentido, la activación de quinasas como las MAPK o PKA intensifica la actividad transcripcional y la acetilación o la ubiquitinación del receptor la reduce drásticamente (39). En otro ejemplo, proteínas como Pak1 o Pak4, median la transactivación de ER $\alpha$  por la fosforilación de la serina en posición 305, lo que resulta en la activación del ER (39,82).

### 3.4.2. Vías de señalización de los ER independientes de ligando

Las vías de señalización de los ER independientes de ligando incluyen al conjunto de rutas de señalización celular mediadas por otros factores de transcripción que culminan con la activación de los ER sin presencia de sus ligandos. En esta modalidad, la actividad, por ejemplo, de proteínas quinasas inducidas por otras vías como MAPK/ERK o PI3K/AKT, producen la fosforilación de los ER, su activación, dimerización, translocación al núcleo y unión al ADN para la regulación de la expresión génica (55,64). Las diferentes modalidades de señalización en las que participan los ER están en una dinámica interacción y diálogo molecular, que hace que la inhibición de una única diana molecular no logre abolir completamente las acciones estrogénicas o reguladoras de los ER (55).

### 3.5. Interconexión entre la ruta de los ER y otras vías de señalización intracelular

Las rutas de señalización celular no actúan aisladamente, sino que existe una amplia interconexión o *crossstalk* entre ellas. De hecho, se han descrito importantes *crossstalk* entre la vía de señalización de los ER y otras rutas moleculares. Un primer ejemplo es la extensa conexión que existe entre la ruta de los ER y la del eje ciclina D-CDK4/6. La estimulación estrogénica de los ER conduce a la activación transcripcional de factores como la ciclina D1, que activan la proliferación celular; o proteínas cruciales como CDK4/CDK6, que desencadenan una activación secuencial de quinasas corriente abajo y promueven un fenotipo de células activadas. La modulación estrogénica del factor E2F es fundamental en la regulación hormonal de la proliferación de células de cáncer de mama ER+. Otros receptores como los correspondientes al tipo de receptores tirosina-quinasa (RTKs), tales como EGFR, HER2, Receptor de Insulina (INSR) o Receptor del Factor de Crecimiento a Insulina (IGFR1) juegan también un rol importante en la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular, llevando su desregulación a procesos de crecimiento tumoral y metástasis (83). Su diálogo con ER se establece a través del dominio AF-1 y la fosforilación del mismo en diversas posiciones (55). El programa de señalización de los RTKs converge en dos de las principales vías de señalización celular, conocidas como PI3K–PKB/AKT/mTOR y *rat sarcoma – Ras/MAPK/ERK*, que también dirigen procesos celulares relevantes en cáncer de mama ER+ (84). Como se comentaba en apartados anteriores, las GPCRs, y especialmente GPER, aparecen sobre-expresadas en cáncer de mama ER+. Su red de señalización interconecta con las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y RAS-MAPK/Raf/ERK (78).

Otra molécula importante en los entramados de los diálogos moleculares cruzados en la señalización de los estrógenos se refiere a la proteína *Hypoxia Inducible Factor* (HIF). Estudios recientes han revelado que se comporta como una diana transcripcional de ER $\alpha$  en tumores en condiciones de hipoxia, lo que garantiza su adaptación metabólica y su supervivencia (85). El



## I. INTRODUCCIÓN

supresor tumoral p53 parece también establecer diálogos moleculares en cáncer de mama ER+. Los ER y p53 parecen regular mutuamente sus niveles de expresión formando interacciones directas entre ellos en respuesta a E2 (11). La proteína c-MYC es un protooncogén y una diana directa del ER $\alpha$  en cáncer de mama. El incremento en sus niveles de expresión está asociado con mal pronóstico, alta capacidad metastásica y resistencia endocrina (11). Las proteínas STAT, especialmente STAT1, STAT3 y STAT5a/b están representadas en todos los subtipos de cáncer de mama. La activación del eje *Janus Kinase 2*(JAK2)/STAT5 desencadena, en último término, la activación de PI3K y mTOR (86).

Además de todos los reguladores comentados, existen moduladores metabólicos con enorme influencia en cáncer de mama ER+. Algunos ejemplos los encontramos en el incremento del metabolismo de la glucosa a través de los transportadores de glucosa GLUT-1, GLUT-2 y GLUT-5; el metabolismo lipídico de los ácidos grasos, con sobre-expresión de enzimas implicadas en la síntesis de 27-hidroxicolesterol; la modulación de enzimas implicadas en el metabolismo de la vitamina B; u otras proteínas como c-MYC, que regulan el metabolismo de algunos aminoácidos como serina, glutamina o glicina en cáncer de mama ER+ (11).

El rápido crecimiento y división de células tumorales requiere suficiente aporte de nutrientes de la sangre, lo que justifica la angiogénesis. Es un proceso en el que los estrógenos participan directamente al estimular la secreción de interleuquina-8 (IL-8) y el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), funcionando ambos como potentes inductores de la angiogénesis (39). En cuanto a la metástasis, la ruta de señalización de los ER mediada por estrógenos no suele estimular este proceso, confiriendo con ello un menor potencial a los cánceres de mama ER+ (38).

### **3.6. Regulación negativa de la ruta de los ER**

En un contexto fisiológico normal, los altos niveles de estrógenos actúan generando un proceso de retroalimentación negativa, induciendo una disminución en su producción al inhibir el eje hipofisario-gonadal y la producción de hormonas GnRH, LH y FSH (39). A nivel celular, la regulación negativa de la ruta de los ER viene definida por distintos niveles. En el primer nivel, se observa que los ER son capaces de regular negativamente sus propios niveles de expresión. Por ejemplo, la activación de la ruta de los ER conlleva la activación de la señalización vía mTOR y PI3K, mientras, que, al mismo tiempo, mTOR y PI3K regulan los niveles de expresión de ER $\alpha$  en tumores de mama ER+ en sendos bucles de retroalimentación negativa (11). Por otro lado, dados los mecanismos que rigen la transcripción génica dependiente de estrógenos a través de los ER y sus ligandos, no es de extrañar que las moléculas co-represoras que interaccionan con algunos de sus dominios funcionen como reguladores negativos de la ruta de señalización de los ER (38). En el último nivel de regulación, los propios ligandos nativos de los ER, tras cierto



tiempo, pueden actuar como elementos de sub-regulación de los receptores y sus co-reguladores fomentando fenómenos de poliubiquitinación, donde aparece involucrada la subunidad 26S del proteasoma. Esta subunidad es una entidad multiproteica con actividad proteasa que permite escindir y degradar proteínas ubiquitinadas (38). Respecto a los ER, la ubiquitinación permite desacoplar los complejos de transcripción y regular negativamente la ruta (42).

### **3.7. Importancia de la vía de señalización de los ER en cáncer de mama ER+**

Aproximadamente, el 70 % de los cánceres de mama dependen de compuestos estrogénicos y su unión a ER (21). Esta dependencia está mediada principalmente a través del ER $\alpha$ , que constituye el principal promotor del cáncer de mama ER+. Su activación aberrante se relaciona con oncogénesis, convirtiéndolo a su vez en una potencial diana terapéutica antitumoral en el tratamiento quimioterápico y en un predictor del pronóstico del tratamiento endocrino (66).

Según los datos de numerosos estudios clínicos y animales, los estrógenos están implicados en la iniciación, promoción y desarrollo de cáncer de mama ER+. La señalización estrogénica tiene un profundo impacto en la forma en la que las células reprograman su metabolismo para atender todas las demandas energéticas durante su proliferación (11). La exposición prolongada del epitelio mamario a estrógenos constituye además un importante factor de riesgo de cáncer de mama. Existen dos mecanismos que dan respuesta a estas evidencias. El primero, se basa en que la unión de los estrógenos a sus ER estimula la proliferación de células mamarias, incrementando el número de dianas celulares a estrógenos. Con ello se generan divisiones celulares y la síntesis de ADN eleva la probabilidad de aparición de mutaciones perjudiciales que comprometan la fisiología normal de las células. El segundo mecanismo se basa en que el metabolismo de los estrógenos induce la formación de productos genotóxicos que generan daños directos en el ADN, resultando en mutaciones puntuales (46).

La ruta de señalización de los estrógenos tiene un papel tan relevante en cáncer de mama ER+ debido a la activación de genes relacionados con la proliferación y supervivencia celular, destacando la inhibición de la apoptosis y la progresión del ciclo celular. Los efectos mitogénicos de los estrógenos se producen especialmente en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, donde c-MYC (tras solo 15 minutos de estimulación estrogénica) o la ciclina D1 son genes efectores cruciales en la estimulación estrogénica. La inhibición de la actividad de estas proteínas interrumpe la proliferación de células de cáncer de mama, mientras que su inducción exógena mimetiza los efectos de los estrógenos y reanuda el ciclo celular en células tratadas con antiestrógenos (87). Además, el complejo ER $\alpha$ -estrógenos interactúa con proteínas como c-Src a través de un mecanismo no genómico, activando las rutas de las MAPK y PI3K/AKT, relacionadas con la supervivencia celular (39). Paralelamente los estrógenos inhiben la apoptosis al sobre-expresar las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL en células de cáncer de mama (88),

si bien parece que también inducen apoptosis bajo determinadas circunstancias (39). La señalización ER-E2 no induce generalmente metástasis, aunque sí la migración celular al inhibir NF- $\kappa$ B y reprimir con ello la expresión de la cadherina E. Curiosamente, la sobre-expresión de co-reguladores de los ER, tales como AIB1 o SRC-1 promueve un fenotipo de mayor invasividad y metástasis (39). Por otro lado, la señalización estrogénica sobre-expresa factores transcripcionales como GATA3 y FOXA1, promoviendo la diferenciación del epitelio mamario (38).

### **3.8. Terapéutica del Cáncer de mama ER+**

El cáncer de mama no metastásico se aborda generalmente con terapia local y consiste en la extirpación quirúrgica con posible radiación postoperatoria si se desarrolla una lumpectomía. En determinadas ocasiones, la estrategia anterior se acompaña de terapia sistémica antes o después de la cirugía. La terapia sistémica del cáncer de mama difiere en función del subtipo tumoral. Las estrategias pueden resumirse, de forma muy genérica en el empleo de antiestrógenos (terapia hormonal) en cáncer ER+; terapia con anticuerpos específicos (trastuzumab) en cáncer HER2+; y tratamiento con quimioterapia y moléculas intracelulares en cáncer TNBC (89).

Las estrategias antiestrogénicas constituyen el principal tratamiento del cáncer de mama, dada la alta incidencia de cáncer de mama ER+ (39). La expresión positiva de ER+ está correlacionada con un pronóstico favorable y funciona como un factor predictivo de la respuesta al tratamiento hormonal. De ahí que la estrategia terapéutica de primera línea sea el uso de moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs), degradadores selectivos de los receptores estrogénicos (SERDs) e inhibidores de aromatasa (AIs) (11,90). El uso clínico de cada estrategia sigue guías de tratamiento específicas según factores como el grado, fase y características del tumor, la edad de la paciente y su historial familiar previo (91).

La relación entre el crecimiento del cáncer de mama ER+ y los factores hormonales no se establece hasta que se hace evidente la dependencia que ciertos tumores presentan hacia los estrógenos para crecer y desarrollarse. Uno de los primeros pasos en la terapéutica del cáncer de mama hormonal surge a partir de la observación de que la ablación de estrógenos mediante ooforectomías quirúrgicas impide el desarrollo normal de tumores mamarios ER+ en mujeres premenopáusicas (92). En otras investigaciones previas a la introducción del SERM tamoxifeno, se intenta abordar el tratamiento con altas dosis de estrógenos como DES, lo que parece inducir la regresión tumoral de tumores hormono-dependientes en mujeres postmenopáusicas (39,91). Experimentos posteriores darían soporte a las tesis de Beatson y colaboradores (93), evidenciando que los estrógenos ováricos contribuían a la iniciación y progresión del cáncer. Esto consolidaría la convicción de desarrollar agentes que interfirieran en la señalización estrogénica y de ahí que la terapéutica del cáncer de mama ER+ se base en el empleo de compuestos que bloqueen los

efectos estrogénicos sobre la mama o que impidan la conversión de andrógenos en estrógenos (64). El primer caso se lograría reduciendo los niveles de E2 o inhibiendo la señalización mediada por E2 gracias al empleo de SERMs y SERDs (55), mientras que el segundo lo haría mediante el uso de AIs (14).

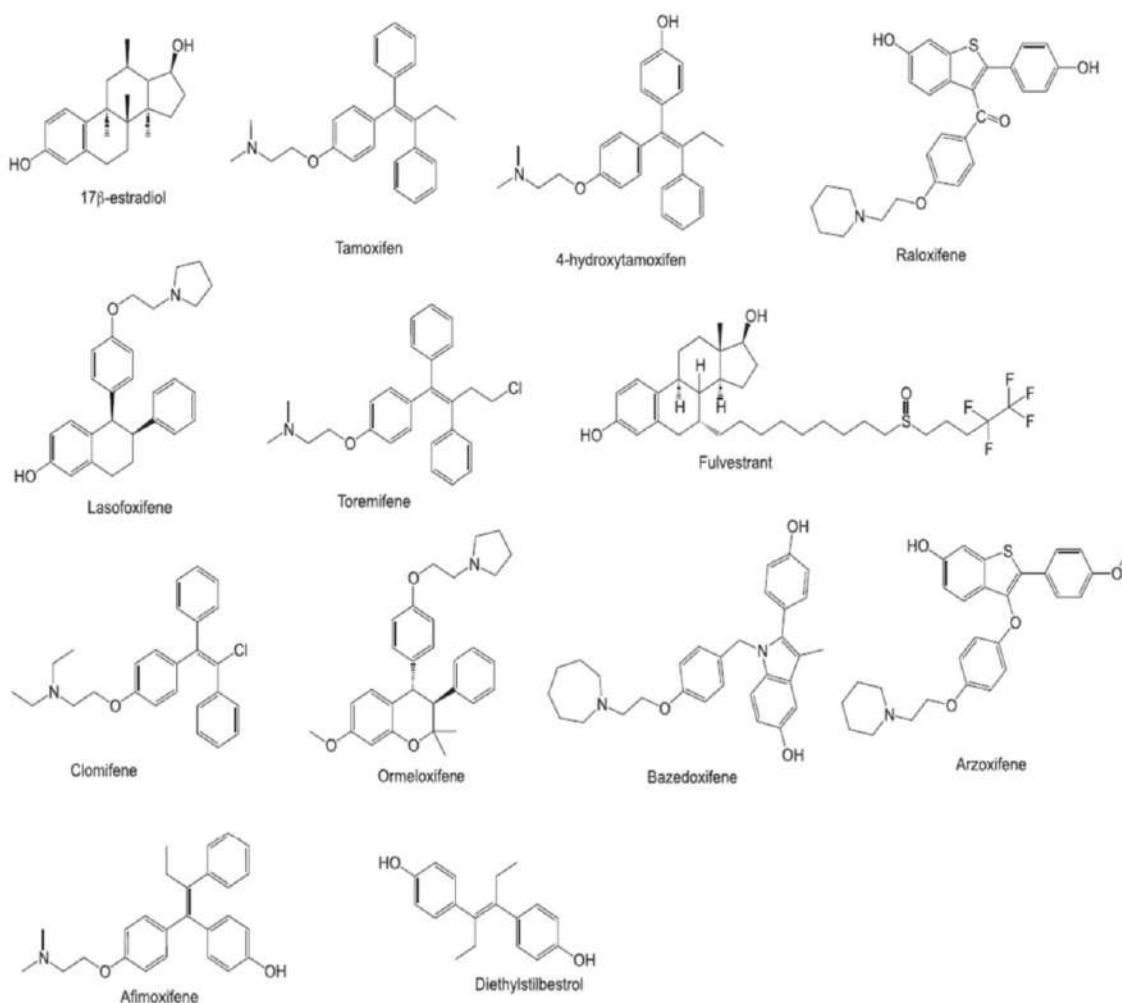
La terapia hormonal, representada principalmente por el tamoxifeno (y el 4-OHT) ha sido utilizada desde su descubrimiento en el tratamiento de cánceres mamarios avanzados, como quimioterapia adyuvante y neoadyuvante, así como en la prevención del cáncer de mama ER+ (55,90). Sin embargo, su utilización no está exenta de problemas, ya que su tratamiento prolongado genera la aparición de resistencias endocrinas y efectos adversos (39), observándose resistencia a hormonoterapia hasta en un tercio de los tumores ER+ (11). Esto ha obligado a desarrollar otras estrategias terapéuticas basadas en la búsqueda de moléculas capaces de unirse al ER en su LBD y funcionar como antagonistas estrogénicos, tanto parciales/mixtos como antiestrogénicos puros (38). El mercado potencial de los SERMs es tan amplio que ofrece grandes oportunidades en el descubrimiento de nuevos productos originales.

### **3.8.1. Modalidades de terapia endocrina en cáncer de mama ER+**

Se diferencian al menos seis modalidades de terapia endocrina en el tratamiento del cáncer de mama ER+ y HER2+: SERMs, SERDs, AIs, inhibidores de mTOR en combinación con AIs, inhibidores de quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (CDK4 y CDK6) en combinación con AIs, e inhibidores CDK4/CDK6 en combinación con SERDs (55). Actualmente, la utilización clínica de SERMs y SERDs se refiere a terapia neoadyuvante o adyuvante tras una terapia primaria basada en cirugía (mastectomía o lumpectomía) e irradiación en cánceres de mama de estadio temprano (54). SERMs, SERDs y AIs son también utilizados en combinaciones entre y ellos y con inhibidores de CDK4/CDK6 para el cáncer de mama metastásico (55). La introducción de terapias hormonales combinadas con AIs de tercera generación ha mejorado en algunos casos el tratamiento, llevando a la retirada de la ablación ovárica como terapia sistemática del tratamiento del cáncer de mama ER+ luminal A en mujeres postmenopáusicas (30,39). Cabe también hacer una breve mención a una categoría de compuestos conocida como reguladores de actividad estrogénica selectivos de tejido (STEARs, del inglés *Selective Tissue Estrogenic Activity Regulators*) y que son diferentes de los SERMs. Los STEARs no interactúan directamente con los ER y otros receptores nucleares, sino que un precursor hormonal genera metabolitos que tienen un perfil funcional dependiente del tejido. El ejemplo mejor caracterizado de estos compuestos lo encontramos en la tibolona, que muestra actividad estrogénica en hueso y SNC, sin actividad útero- o mamotrófica (38).

### 3.8.2. Moduladores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERMs)

Los SERMs (**Figura 9**) constituyen una categoría de agentes terapéuticos que reúnen a sustancias farmacológicas de estructura química no esteroidea, de bajo peso molecular, con capacidad para unirse con alta afinidad a los ER, y modular agonística- y antagonísticamente su actividad (65,66). También se definen como agentes capaces de producir efectos estro-antiestrogénicos de manera dependiente de tejido, razón por la que se alude a su capacidad selectiva en el acrónimo SERM (38,91). Los fármacos tipo SERM tienen una elevada potencialidad terapéutica. Han sido eficaces para el tratamiento clínico de una variedad de desórdenes, entre los que se incluyen el cáncer de mama y útero dependientes de estrógenos, la osteoporosis, la prevención de enfermedades cardiovasculares o la terapia de reemplazo hormonal para paliar los síntomas de la menopausia (54,66). Además, en los últimos años, se han posicionado como moléculas capaces de prevenir enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (94,95).



**Figura 9.** Estructura química del agonista natural E2 y de los principales fármacos tipo SERM. Ilustración tomada de (54).

## I. INTRODUCCIÓN

El mercado mundial de SERMs es inmenso, lo que justifica su gran actividad industrial y ofrece infinitas posibilidades para la aplicación de proyectos científicos de I+D para la búsqueda e identificación de productos originales. La Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (*Food and Drug Administration*, FDA) ha aprobado hasta la fecha, el uso clínico de cuatro SERMs: tamoxifeno, raloxifeno, toremifeno y bazedoxifeno (39,54).

El mecanismo de acción molecular de estos fármacos se debe, generalmente, a la unión del SERM al ER, a través de su estructura terciaria, del mismo modo que ocurre con los estrógenos naturales. Dicho proceso desencadena una modificación conformacional del ER, particularmente en la hélice 12 del dominio LBD, y se forma un complejo SERM-ER, que interacciona con proteínas co-activadoras o co-represoras para modular selectivamente la transcripción y expresión génica de los ERE (38,90). La gama de efectos farmacológicos desencadenados por un SERM depende de múltiples factores (38,96):

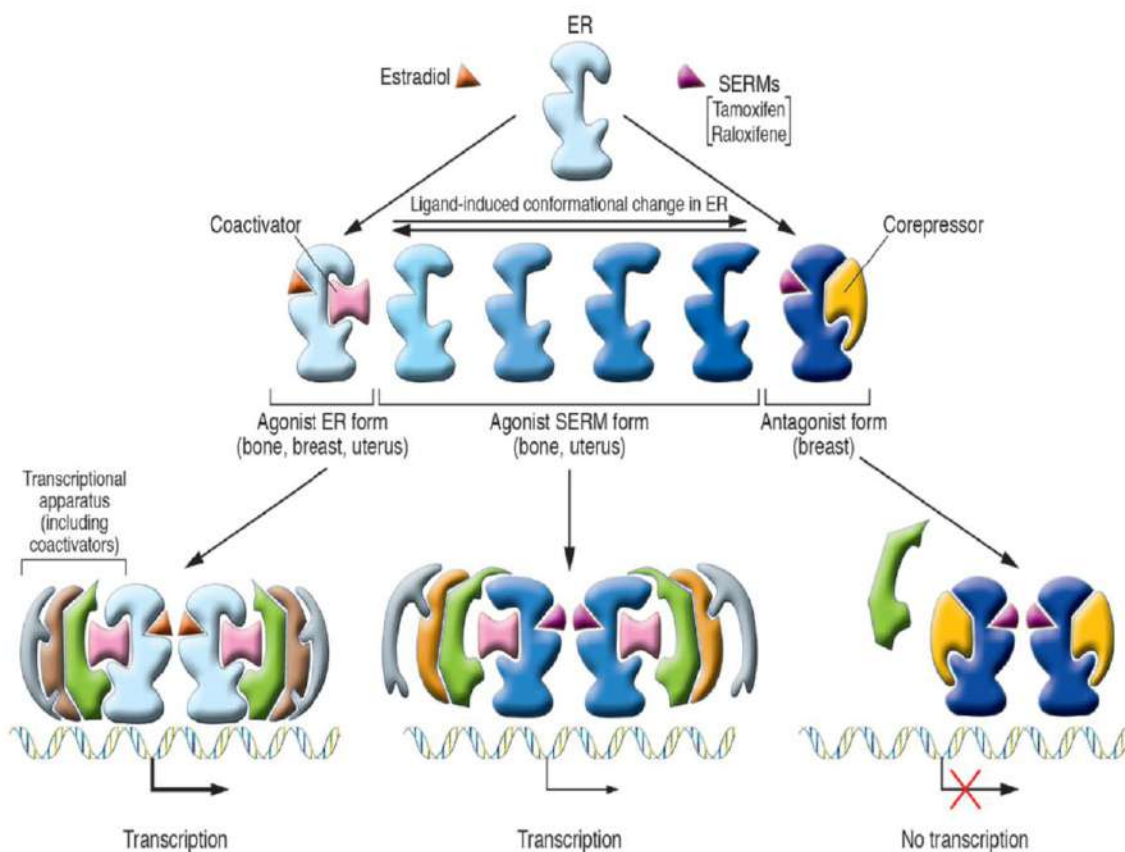
- La naturaleza química y estructura del fármaco.
- La configuración espacial única adquirida en el complejo ER-SERM.
- La interacción del complejo ER-SERM con co-activadores/co-represores reclutados y todo su aparato de transcripción génica.
- Los genes disponibles de una estirpe celular concreta.
- El subtipo de ER y las variantes formadas en los complejos de transcripción.
- La distribución subcelular y contexto tisular, dónde el predominio de un ER sobre otro (balance ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) puede condicionar el efecto del SERM.

Dependiendo de muchos de los factores anteriormente indicados, los SERMs varían su comportamiento desde agonismo-antagonismo puro a actividades estro-y antiestrogénicas mixtas o parciales (**Figura 10**) (46). La mayor parte de ellos presentan actividad estrogénica agonista en hueso, hígado y sistema cardiovascular (66). La actividad antagonista se produce fundamentalmente en la mama, mientras que sus efectos específicos en útero son enormemente variables (96).

La utilización terapéutica de SERMs no está exenta de efectos secundarios indeseables y sus propiedades biológicas dependen del contexto tisular y molecular. Muchos estudios clínicos avalan, por ejemplo, el papel agonista del tamoxifeno o 4-OHT sobre el hueso, aunque también se ha descrito su papel antagonista en este tejido en mujeres premenopáusicas, generando con ello la pérdida de densidad ósea (90,97). Muchos SERMs han mostrado tener incidencia en la aparición de eventos tromboembólicos; o ejerciendo efectos agonistas sobre el útero (efectos uterotróficos) y el ovario, incrementando la probabilidad de desarrollar cáncer y lesiones malignas en estos órganos (90,98,99).



## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 10. Ilustración de la interacción del ER con diferentes ligandos (E2 o SERMs) y la modulación de su actividad.** La unión de diferentes ligandos al ER genera cambios en su estructura e interacciones y faculta la existencia de un espectro de conformaciones del receptor (en estado inactivo y activo). La conformación espacial adquirida dirige el reclutamiento de proteínas co-reguladoras específicas, resultando en una maquinaria transcripcional concreta. Los ligandos del ER que funcionan como agonistas estrogénicos, promueven una conformación que permite la interacción con proteínas co-activadoras como SRC1, dirigiéndose la activación de la transcripción de genes estrogénico dependientes. La asociación de antagonistas estrogénicos genera entre otros efectos estructurales, una alteración de la hélice 12 del receptor, dificultando o impidiendo la interacción con proteínas co-activadoras y promoviendo a su vez el reclutamiento de co-represores de la actividad transcripcional. La inhibición de la transcripción desencadena consecuencias fisiológicas como el bloqueo del crecimiento celular o la inducción de apoptosis. Un mismo SERM puede según su contexto tisular actuar como agonista estrogénico en hueso y útero, pero como antagonista en mama. Es el caso del tamoxifeno, cuya unión al ER regula diferentes *sets* de genes, condicionando diferentes respuestas farmacológicas. Ilustración tomada de Deroo y Korach, 2006 (46).

### 3.8.2.1. Clasificación de los SERMs

Los SERMs pueden clasificarse de diversas maneras. En el artículo de revisión de Smith y colaboradores (38) se plantea una clasificación basada en la biología del SERM de estudio, diferenciando: moduladores selectivos del ER con actividad mixta, moduladores selectivos con actividad estrogénica, moduladores selectivos del PR, moduladores selectivos del AR, moduladores selectivos de receptores de peroxisomas activados por proliferación y otros SERMs. Otra de las clasificaciones reconocidas, se realiza acorde a su estructura química (**Tabla 1**), diferenciándose los siguientes grupos: derivados del trifeniletileno, derivados de benzotiofenos, derivados de benzopiranos, fenilindoles, y tetrahidronaftalenos (54,66,91).

## I. INTRODUCCIÓN

**Tabla 1. Clasificación de los SERMs en relación a su estructura química.**

Trifeniletilenos	Benzotiofenos	Benzopiranos	Fenilindoles	Tetrahidronaftalenos
MER25	Raloxifeno (Ketoxifeno)	Ormeloxifeno	Bazedoxifeno	Nafoxidina
Clomifeno	Arzoxifeno (LY353381)	Levomeloxifeno	Pipindoxifeno (ERA-923)	Lasofoxifeno
Tamoxifeno	LY117018	Trioxifeno		
4-hidroxi-tamoxifeno	LSN2120310	EM652 (Acolbifeno)		
Toremifeno	Pipendoxifeno (ERA-923)	EM-800		
Droloxifeno				
Ospemifeno				
Idoxifeno				

Adaptado y ampliado de (54,91).

### 3.8.2.2. Tamoxifeno

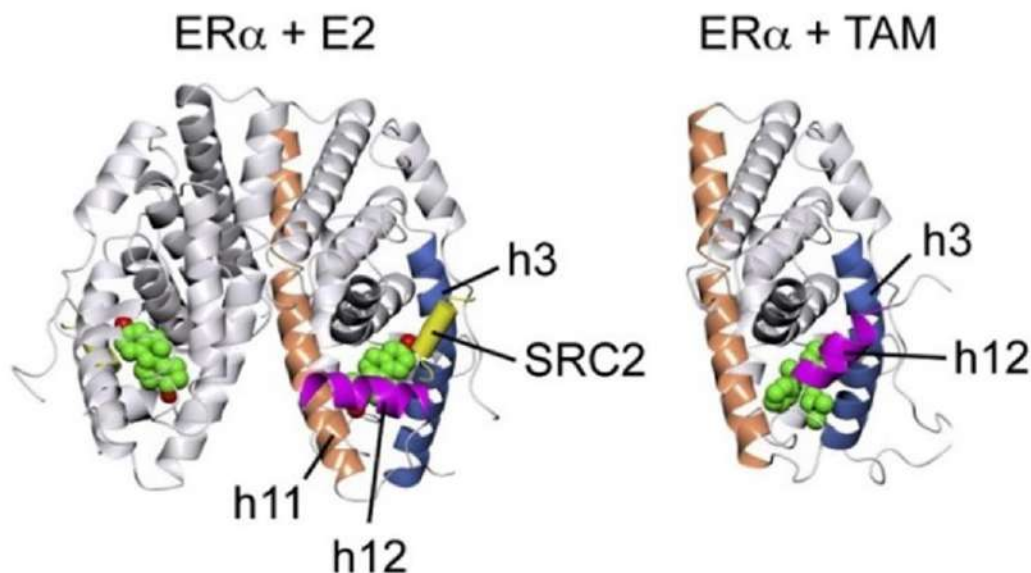
La aparición de la terapia hormonal no habría sido posible sin el descubrimiento del tamoxifeno (100–102). El tamoxifeno, también denominado como ICI 46,474 o comercialmente como Novaldex, es el SERM más conocido y mejor descrito hasta la fecha. Desde el punto de vista químico, se considera un derivado no esteroideo del trifeniletileno (66). Surgió como un derivado sintético del MER25 y es considerado el primer antiestrógeno por su capacidad inhibidora de las acciones estrogénicas (103). Sin embargo, el primer SERM aprobado clínicamente (citrato de clomifeno) no sería validado como tal hasta 1960 para el tratamiento de la disfunción ovulatoria en mujeres (96). El tamoxifeno no fue aprobado por la FDA para el tratamiento y prevención del cáncer de mama hasta 1977 (66).

Tanto el MER25 como el tamoxifeno se consideran derivados químicos del potente estrógeno no esteroideo, DES (54). Desde su descubrimiento por parte de la compañía *ICI Pharmaceuticals* (la actual AstraZeneca, Londres, United Kingdom) en 1967 (100,101), el tamoxifeno estuvo inicialmente destinado para regular la fertilidad, pasando luego a prescribirse para el tratamiento y la prevención del cáncer de mama (38,54). No obstante, su acción generalmente antagonista sobre los ER en células de cáncer de mama contrasta con su actividad agonista sobre el hueso y sistema cardiovascular (con efectos beneficiosos para ambos), así como sobre el endometrio, lo que incrementa el riesgo de cáncer de este tejido (39,47). Según los datos de algunos investigadores, la ocurrencia de cáncer de endometrio se incrementa 2,5 veces en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama primario debido a los efectos uterotróficos secundarios del tamoxifeno (90,98). El uso de SERMs para el tratamiento de enfermedades estrógeno dependientes en mujeres premenopáusicas queda también limitado por los efectos indeseables de estimulación ovárica, formación de quistes y uterotrofia, que la mayoría de ellos ha mostrado en los estudios realizados (104).



## I. INTRODUCCIÓN

Las investigaciones efectuadas en los años 70-80 revelaron que el tamoxifeno competía con el E2 por su unión directa a los ER en ratones, ratas y humanos. Estos estudios también aportarían datos de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del tamoxifeno, cuya modificación metabólica lo convertía en 4-OHT *in vivo* (54). Además del 4-OHT, el N-desmetiltamoxifeno y endoxifeno (END) constituyen los otros metabolitos activos del tamoxifeno (102). A nivel molecular, el tamoxifeno se une al ER $\alpha$  a través del dominio LBD, generando el desplazamiento de la hélice 12 del receptor. En función del tejido diana, el desplazamiento de la hélice 12 promueve el reclutamiento de co-activadores o co-represores que modulan la transcripción de genes ER dependientes (**Figura 11**). En cáncer de mama, la unión del tamoxifeno al ER $\alpha$  favorece el reclutamiento de co-represores, promoviendo un perfil antagonista. El papel agonista del tamoxifeno en endometrio se explica como el resultado del reclutamiento del co-activador SRC1/NCOA-1 al complejo de transcripción ER $\alpha$ -tamoxifeno, lo que desencadena la transcripción de genes ER dependientes, incrementando la proliferación celular (54,78). Adicionalmente, otros estudios determinan la existencia de actividad agonista del tamoxifeno en mama, cuya explicación parece ser consecuencia de la existencia de "*crosstalk*" entre la ruta de señalización de ER $\alpha$  y la de EGFR/HER2. La sobre-expresión de HER2 en xenoinjertos de células de adenocarcinoma humano de mama (MCF-7) en ratones resulta en la proliferación de dichas células en respuesta al tamoxifeno y 4-OHT (105,106).



**Figura 11. Estructuras cristalizadas del LBD del ER $\alpha$  formando un complejo con E2 y tamoxifeno.** ER $\alpha$  adopta diferentes conformaciones en función de la unión de diferentes ligandos a su dominio LBD. Entre los dominios E y F, la región AF-2 ve alterada la posición de la hélice 12 (h12). En el primer caso, cuando un agonista como el E2 se une al LBD, la h12 se pliega horizontalmente entre h11 y h3, favoreciendo el reclutamiento de coactivadores como SRC2 sobre la región AF-2. En el segundo caso, la unión de antagonistas como el tamoxifeno modifica la posición de h12, de manera que bloquea la unión de coactivadores o favorece la unión de correpresores. El tamoxifeno actúa como un SERM, porque en determinados contextos celulares no es capaz de bloquear el AF-1. Ilustración tomada de (107).



## I. INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha, el tamoxifeno y su derivado metabólico 4-OHT son los SERM de mejor perfil farmacológico, mayor eficacia y bajo coste, lo que ha justificado su uso tanto individual como combinado, en cánceres de mama ER+ de distinto grado, incluidos aquellos metastásicos (39) y en mujeres pre- como postmenopáusicas, dónde actúan como antagonistas (90). Conviene, además, resaltar el éxito que ha supuesto el descubrimiento y la comprensión de los efectos del tamoxifeno en la búsqueda bioinspirada de nuevos SERMs (38). Sin embargo y pese a ello, la resistencia adquirida por el tratamiento con tamoxifeno sumado a sus efectos secundarios indeseados, comporta un grave problema clínico (64,102), que justifica la búsqueda de nuevas entidades químicas con mejor perfil farmacológico. En este contexto, se han ido desarrollado SERMs de segunda y tercera generación. Basándose en la estructura química del tamoxifeno, han aparecido otras moléculas como toremifeno, droloxifeno e idoxifeno. Sin embargo, la eficacia de droloxifeno e idoxifeno no es mejor que la del tamoxifeno. Su actividad agonista parcial y la aparición de resistencias cruzadas con otros SERMs y el propio tamoxifeno ha llevado a detener su desarrollo clínico (66).

### 3.8.2.3. Otros SERMs

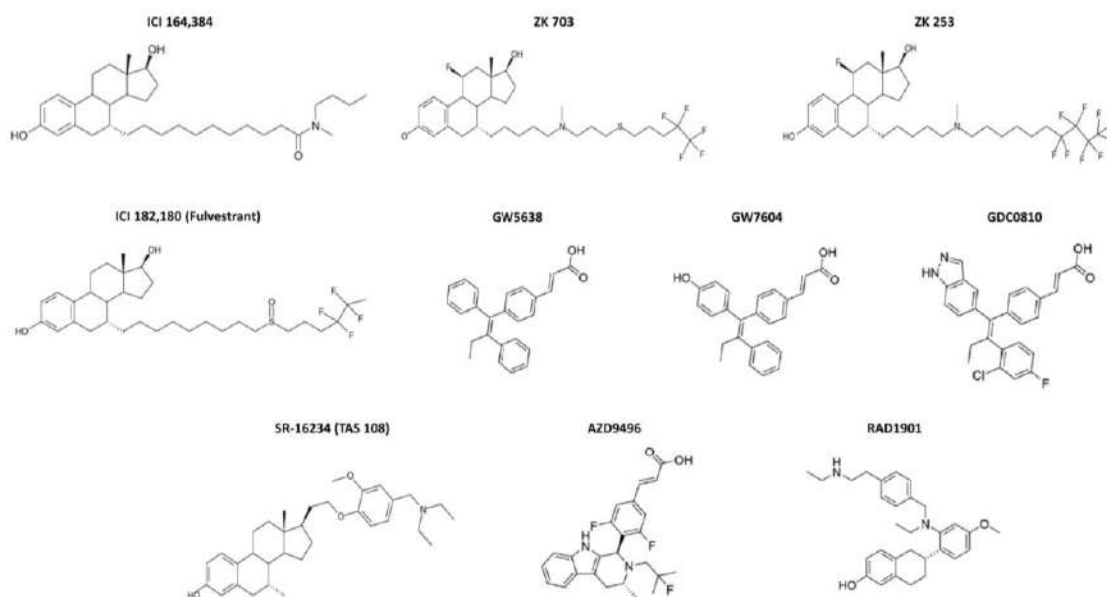
Además del tamoxifeno, en las últimas décadas, se han descubierto otros SERMs con alto interés terapéutico. El toremifeno (comercialmente llamado Fareston) (54) funciona como un fármaco antiestrogénico en mama y se utiliza en el tratamiento de cáncer de mama ER+ metastásico en mujeres postmenopáusicas y en la prevención del cáncer de próstata (39,64). El raloxifeno constituye otro SERM bien caracterizado, que muestra propiedades agonísticas en hueso o sistema cardiovascular, funcionando contrariamente como antagonista en cáncer de mama ER+ y útero (108,109). Inicialmente desarrollado para el tratamiento del cáncer de mama ER+, el raloxifeno es actualmente la opción preferida por los expertos en la prevención y tratamiento de la osteoporosis, mostrando una eficaz reducción de fracturas óseas, incremento/preservación del hueso y menor efecto uterotrófico que el tamoxifeno (54,90). Por último, el bazedoxifeno (también llamado WAY-140424 o bajo su nombre comercial Conbriza) es otro SERM aprobado por la FDA para el tratamiento y prevención de la osteoporosis en mujeres postmenopáusicas (66). Su actividad antitumoral en cáncer de mama ha sido estudiada tanto *in vitro* como a nivel clínico (91).

### 3.8.3. **Degradadores Selectivos del Receptor de Estrógenos (SERDs)**

Los SERDs responden a un conjunto de sustancias farmacológicas de estructura esteroidea con propiedades antagonistas sobre el receptor de estrógenos. Su mecanismo de acción sobre el ER es diferente al de los SERMs debido al tipo de interacción que establecen. Este implica el bloqueo directo de la superficie del dominio co-regulador AF-2 del ER, lo que dificulta la

## I. INTRODUCCIÓN

dimerización del ER por impedimento alostérico, mostrando además una afinidad de unión superior a SERMs como el tamoxifeno (90). Tras la asociación a un SERD, el receptor es ubiquitinado y rápidamente enviado y degradado en el proteasoma, lo que conduce a la reducción de los niveles celulares del ER, bloqueándose la expresión de genes dependientes de estrógenos y, con ello, el crecimiento de los tumores ER<sup>+</sup> (110,111). Este efecto antiestrogénico puro es exclusivo de los SERDs y conlleva a denominarlos como subreguladores, “*downregulators*”, puesto que carecen de efectos estrogénicos sobre el endometrio (112). Los SERDs mejor estudiados incluyen al ICI 164,384, ICI 182,780, SR 16234 (TAS 108), ZK 703, ZK 253, GW5638, GW7604, GDC0810, AZD9496 y RAD1901 (Elacestrant) (90,91) (**Figura 12**).

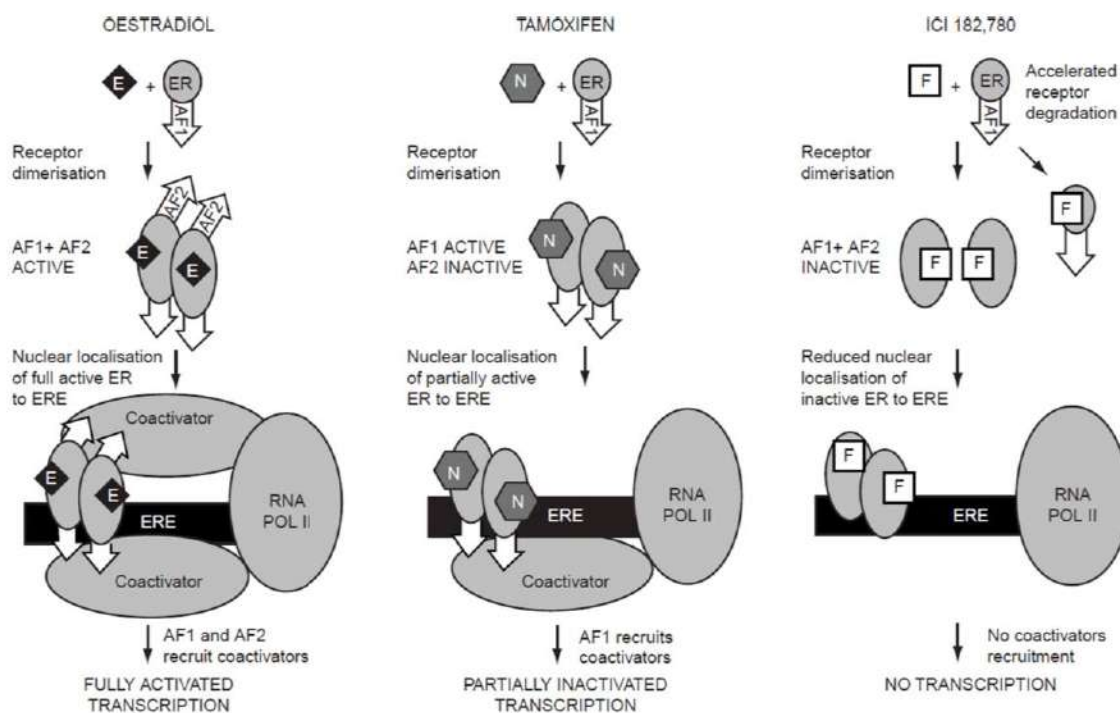


**Figura 12.** Estructura química de los principales fármacos tipo SERD. Ilustración adaptada de (90,91).

### 3.8.3.1. ICI 182,780 (Fulvestrant)

El ICI 182,780 (ICI) (también llamado Fulvestrant o a nivel comercial Faslodex) es el SERD más popular y representativo de su grupo. Se desarrolló a partir del ICI 164,384 (91,113), que es considerado el primer antiestrogénico puro, dada su actividad antagonista en mama, acompañada de la ausencia de agonismo en todos los tejidos ER<sup>+</sup> (114). El ICI constituye un análogo estructural (7 $\alpha$ -alquilsulfínil) del E2 y es considerado un antagonista estrogénico puro tanto del ER $\alpha$  como ER $\beta$  (90). Fue descubierto por *ICI Pharmaceuticals* y comercializado por AstraZeneca a finales de la década de los 80 (113). Su mecanismo de acción molecular es diferente al de los SERMs (**Figura 13**), ya que involucra su unión a los ER y el bloqueo de la región AF-2, en el punto de unión de los co-reguladores. Esto impide la dimerización del receptor, promoviendo su inhibición, degradación proteasómica y recambio (en inglés, “*turnover*”) en las células que lo expresan (39,64).

## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 13. Ilustración de los mecanismos de acción del E2, tamoxifeno e ICI.** Cada compuesto difiere en su mecanismo de acción molecular a nivel de los ER. En condiciones fisiológicas, el ligando natural E2 se une al receptor promoviendo la formación de un complejo ligando-receptor activo, la dimerización, la translocación a regiones ERE del núcleo y el reclutamiento de co-reguladores que activan la transcripción génica. En el caso de otros SERMs, como por ejemplo el tamoxifeno, la unión del antagonista promueve la formación de un complejo ligando-receptor con el dominio AF2 del ER inactivo, lo que afecta a los sucesivos procesos y se salda con una transcripción parcialmente impedida. El ICI por contra, se une al ER, promoviendo la inactivación de sendos dominios AF1 y AF2, afectando a la dimerización y translocación nuclear de los ER. Todo ello produce una degradación proteica acelerada del receptor y, como consecuencia, una transcripción prácticamente nula. Ilustración adaptada de Robertson, 2001 (111).

El ICI no presenta efectos agonistas sobre los ER (115) y presenta una afinidad de unión por los mismos superior a la de su ligando natural E2 (54). Este fármaco posee una mayor efectividad que el tamoxifeno en la inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y en la progresión tumoral de pacientes con cáncer de mama ER+ (54,113). Dispone de una vida media superior a la del tamoxifeno (54) y, además, parece ser efectivo en líneas celulares sensibles y resistentes al tamoxifeno (116). En sus primeros años, el uso clínico del ICI estaba indicado como tratamiento de tercera línea del cáncer de mama ER+ metastásico en mujeres postmenopáusicas (39,113). Actualmente, es un compuesto aprobado para el tratamiento del cáncer de mama con progresión de la enfermedad tras el tratamiento con tamoxifeno (66). Sin embargo, presenta problemas de biodisponibilidad debidos a su baja solubilidad y alta labilidad metabólica, lo que condiciona su eficacia *in vivo* (117,118). A todo ello habría que sumar las claras evidencias de aparición de resistencia endocrina (118), así como alteraciones en la función cerebral por bloqueo total de los ER, lo que ha restringido su uso clínico (64) y hace que continúe en estudio (91).

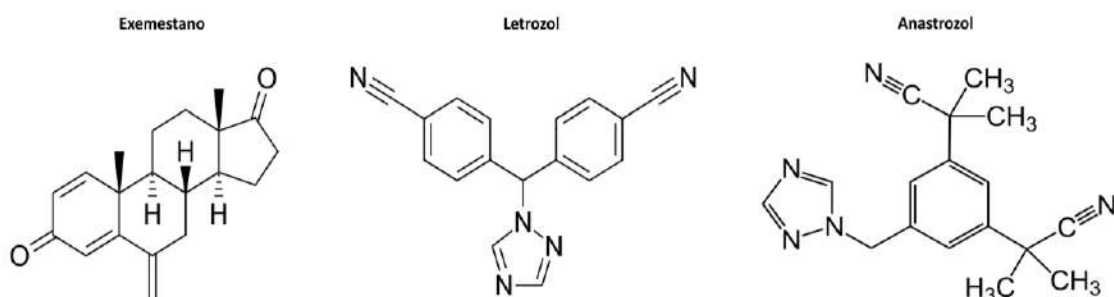
3.8.3.2. Otros SERDs

Además del ICI, en las últimas décadas se han ido desarrollando otros SERDs con perfiles farmacológicos de gran interés. Por ejemplo, el SR 16234 es un compuesto esteroideo de gran afinidad por el ER $\alpha$ , que actúa como antagonista específico de dicho receptor, mostrando un leve efecto agonista sobre ER $\beta$ . Según los estudios en modelos animales dispone de un perfil benigno, con respecto a sus efectos uterotróficos mínimos. Otros antiestrógenos puros incluyen a los compuestos ZK 703 y ZK 253. Estos presentan mayor eficacia antitumoral que el tamoxifeno y el ICI *in vivo*, lo que les sitúa como fármacos interesantes, aún sin explorar a nivel clínico (90).

3.8.4. **Inhibidores de Aromatasa (AIs)**

La aromatasa es la enzima responsable de catalizar el paso limitante en la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos. Los inhibidores de esta enzima conforman un grupo de fármacos dirigidos en el tratamiento del cáncer de mama con expresión de receptores hormonales (39). Su acción antitumoral se debe a la reducción de los niveles de estrógenos y a la prevención en la formación de metabolitos estrogénicos genotóxicos, lo que implica la disminución de la proliferación celular (66).

Se diferencian dos clases de AIs: tipo I y tipo II. Los inhibidores de tipo I tienen una estructura esteroidea similar al sustrato de la aromatasa, la androstenodiona, lo que facilita que la unión covalente entre estos fármacos y la enzima la inhiba irreversiblemente. Los inhibidores de tipo II muestran estructura no esteroidea, establecen uniones no covalentes con la aromatasa y generan con ello efectos inhibitorios reversibles por la competición de andrógenos (39). La FDA ha aprobado el uso de tres AIs, que son implementados en la práctica clínica para el tratamiento del cáncer de mama ER+ en mujeres postmenopáusicas: anastrozol, letrozol (inhibidores de tipo II) y exemestano (inhibidor de tipo I) (**Figura 14**) (66). Otros AIs conocidos y bien caracterizados incluyen a compuestos como la aminoglutetimida, formestano, fadrozol y vorazol (66).



**Figura 14. Fármacos tipo AIs aprobados por la FDA.** Estructura química de exemestano (inhibidor de tipo I), letrozol y anastrozol (inhibidores de tipo II). Ilustración adaptada de (119).

## I. INTRODUCCIÓN

La aplicación de los AIs como tratamiento antitumoral administrado durante 5 años individualmente o combinado durante 2 o 3 años antes o después del tratamiento con tamoxifeno, parece disminuir la recurrencia del cáncer de mama en mujeres postmenopáusicas. También se han usado en tratamiento combinado con radiación y quimioterapia en cáncer endometrial metastásico (39). Los AIs pueden ser efectivos en casos de cáncer de mama resistentes al tamoxifeno porque, a nivel molecular, reducen la biosíntesis de estrógenos en lugar de antagonizar sus acciones en las células (39). El tratamiento combinado de AIs y la supresión ovárica (tanto ablación ovárica como supresión farmacológica) mejora la supervivencia libre de la enfermedad, pero no está exento de efectos adversos en mujeres postmenopáusicas que hayan desarrollado resistencia a los SERMs (55,120).

El empleo exclusivo de AIs para el tratamiento del cáncer de mama hormonal en mujeres premenopáusicas no funciona correctamente, ya que los ensayos clínicos apuntan a la adquisición de resistencia hormonal (64). Esto se explica porque los AIs producen un bloqueo incompleto en la síntesis de estrógenos, generando un bucle que incrementa los niveles de gonadotropinas, que a su vez estimulan la aromataasa ovárica y superan la inhibición estrogénica (66). Además el uso prolongado de AIs se ha indicado que acelera la pérdida de densidad ósea (121).

### **3.8.5. Resistencia a terapia hormonal en cáncer de mama ER+**

A pesar de la demostrada efectividad del tamoxifeno y de algunas terapias combinadas de SERMs, SERDs, AIs y otros fármacos en el tratamiento adyuvante/neoadyuvante del cáncer de mama ER+ en mujeres pre- y postmenopáusicas, la aparición de resistencia a la terapia hormonal supone un desafío clínico de primer orden. Un número significativo de pacientes con cáncer de mama ER+, que inicialmente responden a la terapia antiestrogénica, se vuelven refractarios y exhiben una enfermedad más agresiva y de peor pronóstico (39) por la aparición de mecanismos de resistencia. La resistencia endocrina se define, de forma general, como la reaparición del cáncer durante la terapia hormonal adyuvante en un determinado período o la reaparición del cáncer tras completar el tratamiento endocrino (91).

Los mecanismos de resistencia desplegados por los cánceres ER+ son diversos, complejos y su adquisición supone un proceso gradual y de múltiples pasos (55). El tipo de resistencia hormonal podría dividirse en las siguientes categorías: resistencia metabólica por alteraciones en los ER y su ruta de señalización, alteraciones en otras rutas de señalización (como PI3K/AKT, EGFR, otras quinasas o factores de crecimiento), desregulaciones en el ciclo celular y la apoptosis, u otros mecanismos (**Figura 15**).



## I. INTRODUCCIÓN

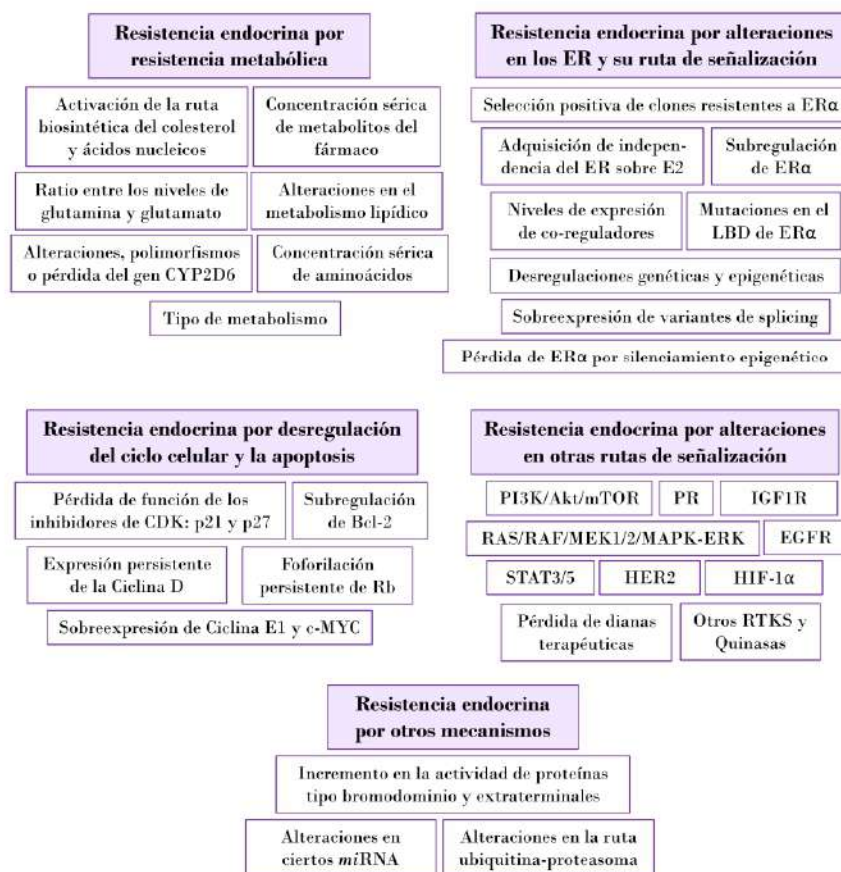


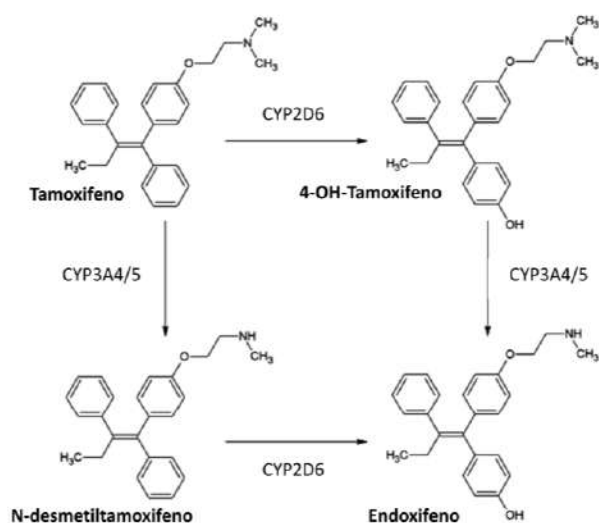
Figura 15. Mecanismos de resistencia endocrina. Esquema de elaboración propia.

En un gran número de pacientes, la resistencia aparece por interferencias redundantes entre el ER y otros factores de crecimiento a nivel molecular. Algunos determinantes de la ineficacia de la terapia endocrina en casos de resistencia se deben a la transformación de un clúster de proteínas E2-dependientes a E2- independientes, lo que supone la regulación de genes en ausencia de señalización E2-ER. De hecho, la desregulación o pérdida de ER $\alpha$  o PR se considera un factor de resistencia en algunos cánceres ER+ resistentes a tamoxifeno (55,90), y mutaciones en el LBD del ER generan resistencia adquirida a los AIs (91). Otros de los mecanismos de resistencia mejor descritos se refieren a desregulaciones genéticas y epigenéticas de los componentes de la señalización estrogénica, desregulación de la señalización mediada por receptores tirosina-quinasa (activación de ERbB/HER2), mutaciones en los ER, PRs, RTKs o señales de proliferación, supervivencia y evasión de la apoptosis (55). La activación constitutiva de rutas como EGFR o PI3K/AKT/mTOR y sus efectores correspondientes provocan una activación de los ER independiente de estrógenos, confiriendo resistencia endocrina. Se estima que cerca del 30 % de los casos de cáncer de mama ER+ presentan mutaciones por ganancia de función de PI3K (91). Según datos clínicos, la sobre-expresión de HER2 parece constituir un importante mecanismo de resistencia tumoral al tamoxifeno. Otras evidencias sugieren que pacientes con altos niveles de expresión del co-activador AIB1 a nivel transcripcional, en combinación con una

## I. INTRODUCCIÓN

alta tasa de expresión de HER2 son indicativos de una mala respuesta al tratamiento con tamoxifeno (64).

La existencia de mecanismos como la sobre-expresión de variantes de *splicing* de ciertas proteínas involucradas en la señalización de los ER parece explicar también la aparición de ciertos casos de resistencia endocrina (39). Para explicar este fenómeno, algunos estudios señalan a factores dependientes del metabolismo de cada paciente, como pueden ser la concentración sérica de metabolitos activos del fármaco utilizado o el genotipo de enzimas de la familia citocromo P450 (CYP), entre las que destacan CYP2D6 y CYP3A4/5 (120) (**Figura 16**). Otros datos clínicos apuntan al empleo del ratio entre los niveles de glutamina y glutamato como biomarcador de la agresividad tumoral y la existencia de resistencia endocrina en células de cáncer de mama (11).



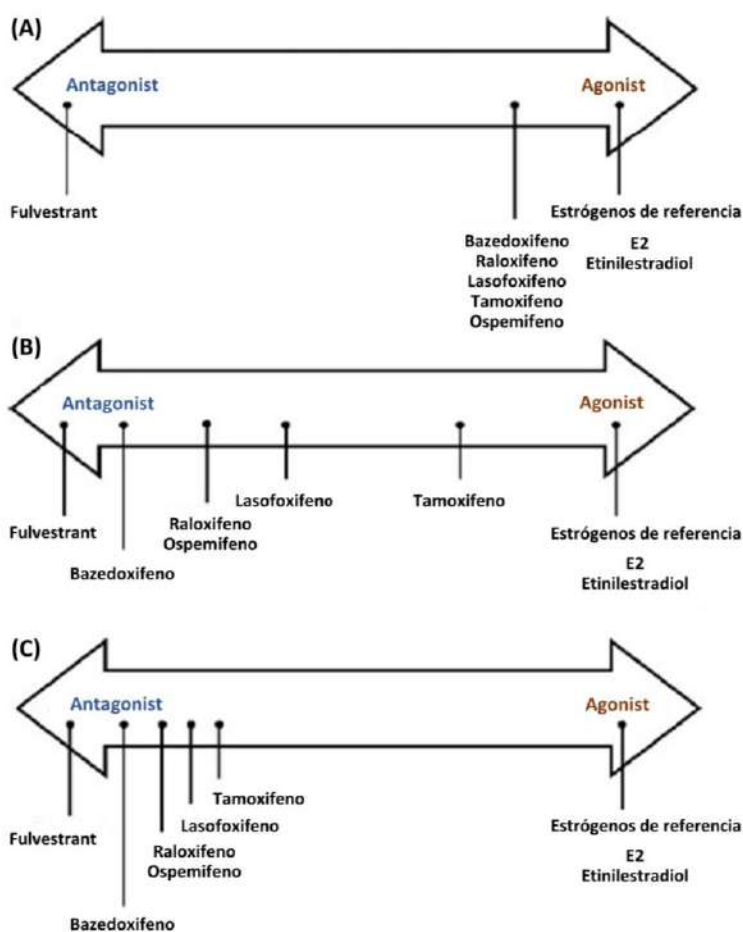
**Figura 16. Biotransformación del tamoxifeno mediado por enzimas de la familia del citocromo P450: CYP2D6 y CYP3A4/5.** La enzima CYP2D6 es responsable de la activación biológica del tamoxifeno, dirigiendo la conversión de dicho fármaco a 4-OHT, que sería posteriormente metabolizado a endoxifeno en un proceso catalizado por la CYP3A4/5. El tamoxifeno es convertido en N-desmetiltamoxifeno por acción de la propia CYP3A4/5 y este puede seguidamente metabolizarse en endoxifeno por la intervención de CYP2D6. Endoxifeno y 4-OHT constituyen los metabolitos activos más potentes del tamoxifeno y en los que reside gran parte de la actividad biológica. Ilustración adaptada de (120).

Otros investigadores señalan a la presión terapéutica ejercida por un fármaco como el mecanismo de adquisición de resistencia, bien por pérdida de la diana terapéutica o por selección positiva de clones resistentes. Un ejemplo de este fenómeno se observa en la adquisición de resistencia al tratamiento hormonal con tamoxifeno o AIs en pacientes portadores de mutaciones en el gen *ESR1*, que codifica el ER $\alpha$  (122). Estos pacientes, cuya expresión de ER $\alpha$  los hacía susceptibles de tratamiento hormonal mostrarían dificultades en un escenario en el que se produce la mutación del gen, haciendo que la hormonoterapia deje de estar específicamente dirigida a los ER. En el abanico de posibilidades de los mecanismos descritos, ninguno ofrece explicaciones completas para el fenómeno de resistencia endocrina (55). Por esta razón, en la terapéutica del cáncer de mama deben considerarse los factores que promueven la resistencia endocrina e integrarlos en la complejidad de la enfermedad. Esto permitirá promover soluciones como los estudios de combinación de fármacos en una estrategia terapéutica que vaya dirigida al ER, así como otras rutas involucradas en la resistencia endocrina a antiestrógenos y la progresión del cáncer de mama (91).



### 3.8.6. Búsqueda de SERMs/SERDs con propiedades óptimas

La noción de que un mismo fármaco puede presentar perfiles farmacológicos diferentes en función de su contexto tisular (**Figura 17**), apoya la necesidad de encontrar compuestos con propiedades SERMs más selectivos y con mejores perfiles farmacológicos (38,54). El SERM ideal sería una molécula que antagonizara los efectos ER dependientes en cáncer de mama y endometrio, favoreciendo una actividad agonista en hueso, sistema cardiovascular y SNC (123). Tendría, por tanto, que representar beneficios con respecto a la prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares, aliviamiento de los síntomas de la menopausia y osteoporosis, así como de la mejora de las funciones cognitivas con respecto a otros SERMs existentes. Todo ello con mayor eficacia y menor toxicidad, especialmente en términos de riesgo de cáncer de endometrio y eventos tromboembólicos (124). A nivel molecular, este SERM ideal debería generar el reclutamiento de proteínas co-reguladoras particulares de una forma gen-promotor específica (54). Adicionalmente, la búsqueda de SERMs o SERDs debe estar orientada al descubrimiento de nuevas entidades químicas que superen la resistencia frecuentemente generada por los tratamientos actuales (91).



**Figura 17.** Efectos específicos de SERMs y SERDs sobre el ER en diferentes tejidos diana. Un mismo fármaco puede presentar perfiles farmacológicos diferentes en función de su contexto tisular: (A) hueso, (B) endometrio, (C) mama. Ilustración tomada de (109).

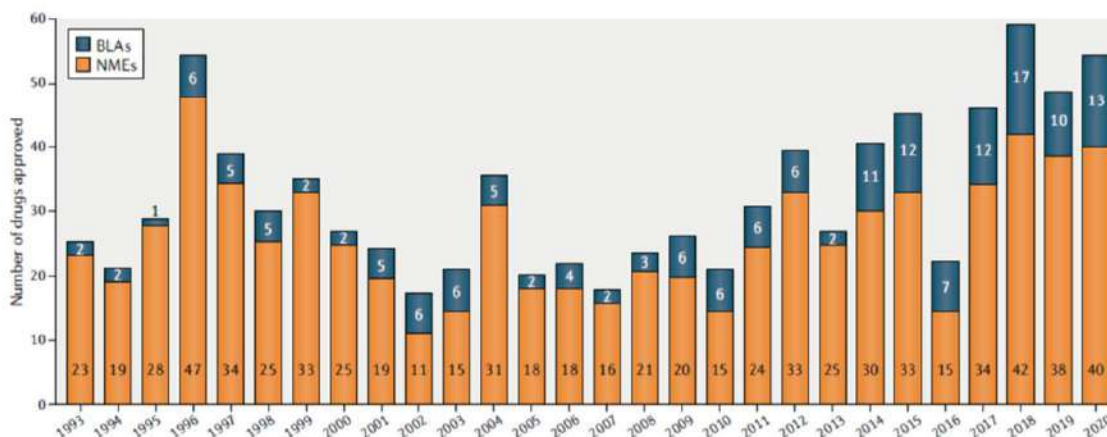
## 4. Descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos

### 4.1. Evolución histórica y fases en el descubrimiento de fármacos

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos es un proceso dinámico, cuyo enfoque ha variado con los conocimientos y avances científico-tecnológicos. Históricamente, la identificación de nuevos fármacos se produce a partir de productos naturales y derivados de productos naturales con propiedades farmacológicas (125). Inicialmente, la casuística se explicaba por el ensayo de extractos de plantas sobre animales o células, lo que facultaba el estudio de cambios fenotípicos (características observables) sobre los mismos (126). Hace poco más de 200 años, Friedrich Sertüner aisló la morfina a partir del opio, siendo esta considerada el primer compuesto puro con propiedades farmacológicamente activas. Desde entonces, la investigación farmacéutica no ha cesado en el empeño de identificar, aislar, purificar, estudiar y administrar nuevos productos naturales con potencial farmacológico (antibiótico, antiparasitario, antimalárico, control metabólico, inmunosupresores y antitumorales, entre otros), así como sintetizar nuevas entidades químicas, promoviendo con ello una auténtica revolución en la medicina tradicional e incrementando la esperanza de vida (127).

En el siglo XX, los avances en el conocimiento de ramas de la biología condujeron a un cambio de paradigma en el descubrimiento de nuevos fármacos, pasando de una estrategia basada en el cambio fenotípico de un organismo expuesto a un posible fármaco, a una estrategia basada en la unión de un compuesto químico a una diana terapéutica concreta implicada en una enfermedad determinada (128,129). El concepto de "bala mágica" de Paul Ehrlich impulsaría el desarrollo de nuevas moléculas en el último siglo con el pretexto de mejorar la productividad y el éxito del fármaco (130). Este enfoque de cribado basado en dianas terapéuticas ha sido el predominante en las últimas décadas, si bien el cribado fenotípico ha demostrado su efectividad y recuperado su importancia en la búsqueda de nuevas entidades moleculares (131). Ambos enfoques para el descubrimiento de fármacos han llevado a la aprobación de un número creciente de moléculas y terapias por parte de la FDA. En el año 2020 y pese a la pandemia de COVID-19, la FDA, a través del Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER), aprobó 53 nuevos agentes terapéuticos, que incluyen tanto nuevas entidades moleculares (NMEs) como solicitudes de licencias biológicas (BLAs) (132) (**Figura 18**). El descubrimiento de fármacos es un proceso largo y económicamente costoso (la inversión media es de 800 millones de dólares y de 10-15 años por fármaco) (133), debido a todas las condiciones que deben cumplirse para su comercialización y administración a personas en términos de eficacia, seguridad y calidad (126,127).

## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 18. Nuevos fármacos aprobados por la FDA desde 1993 hasta 2020.** Se representan el número anual de nuevas entidades moleculares (NMEs) y solicitudes de licencias biológicas (BLAs) aprobadas por el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER) de la FDA. Ilustración tomada de Mullard, 2020 (132).

En el modelo clásico de descubrimiento de fármacos se diferencian las siguientes fases: etapa de descubrimiento y optimización, etapa de desarrollo y etapa de mercado (**Figura 19**). La primera de ellas comienza al investigar una patología. Luego, se identifican y validan posibles dianas terapéuticas asociadas a la misma, se ensayan e identifican compuestos químicos denominados “*hits*” (moléculas que muestran actividad biológica). Estos compuestos son de enorme interés por sus características observadas de potencial bioquímico, *in silico*, o de afinidad. A partir de los *hits* se ejecuta una etapa conocida como “*hit-to-lead*”, donde los primeros pasan a constituir líderes con actividad biológica conocida. Los líderes específicos pueden ser optimizados mediante modificaciones químicas en un proceso conocido como “*lead optimization*”, que permite obtener mejores compuestos con mejores propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. En este punto, las moléculas seleccionadas pasan a la etapa de desarrollo, donde son sometidas a evaluación preclínica (ensayos *in vitro* e *in vivo* para testar su seguridad, formulación, biodisponibilidad y otras propiedades farmacológicas) y, en caso de superarla, son autorizadas para ensayos en sucesivas fases clínicas (I, II y III) (133). La fase clínica I establece el perfil de seguridad, los efectos farmacológicos (incluidos los secundarios), los cambios metabólicos, el mecanismo de acción del fármaco e incluso relaciones estructura-actividad (SAR) sobre 20-100 humanos. La superación de la fase I conlleva el inicio de estudios en fase II, donde se valoran la eficacia farmacológica, la seguridad y distintos regímenes de dosis en grupos de sujetos de entre 100 y 300 personas durante un tiempo más largo. Algunos de los parámetros que se evalúan se refieren a propiedades farmacocinéticas, biodisponibilidad, interacciones entre fármaco y enfermedad o interacciones entre fármacos. El análisis de riesgos-beneficios decanta la balanza para que los fármacos ingresen en fase clínica III, donde se continúa la evaluación en grupos de sujetos de cientos o miles de personas y se comparan los resultados con otros tratamientos terapéuticos indicados para una enfermedad concreta (134). Los fármacos



## I. INTRODUCCIÓN

que completan la etapa de desarrollo pasan a la fase de mercado, donde se procede a la minuciosa aprobación por parte de agencias reguladoras (FDA en EE.UU. y Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en España) e ingresan en un último estudio de fase clínica IV. El proceso es complejo y la tasa de éxito baja. Esto se debe frecuentemente a inadecuadas propiedades farmacocinéticas (mala solubilidad acuosa por ejemplo), efectos clínicos perjudiciales y malos perfiles de toxicidad (133).



**Figura 19.** Fases o etapas para el desarrollo clásico de un fármaco. Tomado de (133).

Actualmente, la academia, las agencias reguladoras y la industria farmacéutica contribuyen al descubrimiento de nuevos fármacos (128,134) integrando el descubrimiento de productos naturales con estrategias como la bioinformática (diseño de fármacos asistido computacionalmente), la química combinatoria y el cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*) (135). El abordaje de un enfoque mixto que combine las estrategias de descubrimiento de fármacos y que indague sobre los mecanismos de acción molecular contribuirá sin duda al hallazgo de nuevos compuestos.

En la actualidad existe una necesidad emergente de encontrar nuevas moléculas bioactivas con capacidad potencial de convertirse en fármacos. En relación con el cáncer de mama existen múltiples razones que justifican la búsqueda de nuevos compuestos. Entre ellas, cabe mencionar la ausencia de tratamientos de alta efectividad, la aparición de resistencias al tratamiento farmacológico, la elevada toxicidad, la existencia de efectos adversos o la reducción de la calidad de vida por el uso de fármacos tradicionales. Al mismo tiempo, el conocimiento de los ER como diana molecular asociada a un alto porcentaje de cánceres de mama con resistencias al tratamiento farmacológico, brinda una oportunidad única de identificar NMEs que optimicen los índices terapéuticos de fármacos ya conocidos. La optimización de las estrategias terapéuticas dirigidas a tumores dependientes de hormonas se centra en el descubrimiento de fármacos con perfiles farmacológicos modificados (64).

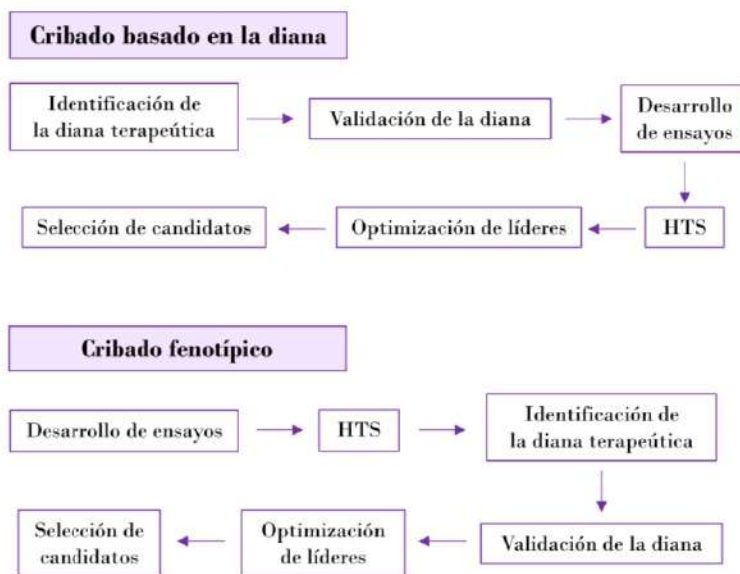
### 4.2. Estrategias de cribado de potenciales fármacos

Los planteamientos para el descubrimiento de compuestos de bajo peso molecular, con interés farmacológico en Medicina están basados, principalmente, en ensayos de cribado *in vitro*. Estos constituyen una herramienta efectiva tanto para identificar las dianas relacionadas con enfermedades, como para establecer un punto de partida adecuado para el descubrimiento de nuevos fármacos. Para ello, se distinguen dos estrategias principales (**Figura 20**), que pueden, en cualquier caso, ser combinadas (136–138):

*Target-based drug discovery (TDD)*. Estrategia de cribado basada en dianas moleculares específicas, ya validadas terapéuticamente. Este tipo de cribados tiene en consideración la identidad de una diana molecular concreta y se basa en la búsqueda de productos que puedan unirse o influir sobre ella y sus productos génicos específicos (129). Entre los métodos empleados en esta estrategia destacan el HTS, el cribado basado en fragmentos, la cristalografía en combinación con modelado molecular, el diseño racional de moléculas, el cribado *in silico*, las técnicas de biología molecular y la química combinatoria (128). Algunos ejemplos del cribado TDD los encontramos en inhibidores tirosina-quinasa para el tratamiento de algunos tipos de cáncer (gefitinib cuya diana es el EGFR, imatinib cuya diana es BCR-ABL o sorafenib dirigido a Raf); y antivirales (como maraviroc dirigido a CCR5, raltegravir que modula la actividad de la integrasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o zanamivir, cuya acción se ejecuta sobre la neuraminidasa del virus de la gripe) (126).

*Phenotypic-based drug discovery (PDD)*. Estrategia de cribado basada en la identificación de cambios fenotípicos en modelos celulares complejos, pero representativos de la patología de interés (por ejemplo, células MCF-7 como línea celular de cáncer de mama ER+). En este caso, los compuestos son identificados, sin conocimientos previos sobre una diana molecular específica, investigando como primer paso las acciones farmacológicas sobre células, tejidos o animales (139). Inicialmente, el PDD se ejecutaba manualmente mediante análisis de 100 compuestos semanales. En la actualidad, la mecanización del cribado permite efectuar ensayos de hasta 10.000 compuestos al día (130). Entre los ejemplos más sonados de fármacos descubiertos mediante PDD destacan ezetimib, vorinostat y linezolid (126). Los avances en los sistemas de análisis basados en células (cultivo en superficies multipocillo, cultivo de células primarias, inducción de células madre pluripotentes, co-cultivos, cultivos 3D, cultivos de organoides) han contribuido al éxito del sistema PDD (129,136).

## I. INTRODUCCIÓN



**Figura 20. Esquema comparativo de las dos grandes estrategias de cribado de fármacos: PDD y TDD.** Modificado y adaptado de Isgut *et al.*, 2018 (130).

El empleo del enfoque fenotípico clásico para la investigación de nuevos fármacos parece ser más efectivo para el descubrimiento de NMEs de primera generación y con bajo peso molecular, frente al éxito de la estrategia TDD para fármacos derivados de los primeros (126). Cada método de cribado presenta ventajas e inconvenientes. La estrategia TDD es más sencilla, rápida y de menor coste de desarrollo y ejecución, permitiendo combinar otras técnicas (cristalografía, modelado molecular, estudios computacionales, estudios SAR) o ramas de conocimiento (química, bioquímica, genómica) para entender la interacción entre un compuesto de estudio y su diana terapéutica. La caracterización molecular de una determinada diana favorece la aplicación de una estrategia TDD (139), pero para ello debe conocerse la complejidad molecular del mecanismo de acción (126). Un posible fármaco puede actuar a nivel de diferentes dianas, mostrar una eficacia que no concuerda con los mecanismos inicialmente esperados o mostrar efectos farmacológicos impredecibles. Esto ha lastrado el éxito de esta estrategia, al no existir frecuentemente una translación de las aplicaciones TDD a la práctica clínica (139). El cribado PDD de librerías químicas ha resurgido en los últimos años, pasando a ser la estrategia preferente de la industria farmacéutica en el descubrimiento y aprobación exitosa de nuevos fármacos. Parte de la explicación reside en la evidencia de que gran proporción de los fármacos descubiertos en las últimas décadas presentan una modulación a nivel de múltiples dianas moleculares, rutas reguladoras y diferentes proteínas (130). Además, los ensayos fenotípicos parecen representar mejor la complejidad de los sistemas biológicos, sin asumir efectos farmacológicos atribuibles a una única diana terapéutica (139). En cualquier caso, la identificación de la diana terapéutica y la comprensión del mecanismo molecular de acción resultan imperativos para el descubrimiento de nuevos fármacos (126).



### 4.3. Construcción de librerías químicas bioinspiradas en productos naturales

La identificación de compuestos con propiedades farmacológicas puede tener diversos orígenes: natural, semisintético, moléculas de bajo peso molecular, biológico o diseño computacional. Los compuestos derivados de productos naturales son aquellos que presentan propiedades farmacológicamente activas derivadas de fuentes biológicas o minerales y que inducen respuestas farmacodinámicas con efectos terapéuticos sobre los organismos o sistemas de estudio (130). Estos productos naturales han conformado la fuente principal de fármacos descubiertos en el pasado y siguen contribuyendo significativamente a la investigación en la actualidad. Fruto de las investigaciones con productos naturales se han identificado compuestos antitumorales tan importantes como el taxol, la camptotecina, vincristina, vinblastina o doxorubicina (DOXO) (140). Los avances científico-tecnológicos han permitido ensayar productos naturales solos o en formulaciones combinadas en experimentos HTS. Además, han inducido una evolución para pasar de productos naturales, a la síntesis de moléculas de bajo peso molecular, donde miles de moléculas son analizadas por HTS, química combinatoria o bioinformática frente a una diana biológica que opera en un proceso biológico concreto (135).

En el proceso de búsqueda de moléculas con actividad biológica se dispone, a nivel teórico, de todo el espacio químico, constituido por más de  $10^{63}$  moléculas orgánicas de bajo peso molecular (<500 Da) y que poseen propiedades aceptables para constituirse como fármacos (141). Si bien no todo ese espacio tiene relevancia biomédica, existe una superposición de espacios químico y biológico a través de productos naturales con estructuras químicas previamente validadas biológicamente, como por ejemplo los ER y los estrógenos. Constituyen estructuras privilegiadas, debido a que la información contenida en sus estructuras ha sido codificada molecularmente durante la evolución. Por esta razón, los motivos estructurales y esqueletos base presentes en los productos naturales bioactivos pueden servir como los llamados “*chemical navigators*”, actuando de guías estructurales en la síntesis de nuevas moléculas del espacio químico biológicamente relevante (142). De hecho, en cáncer, el 75% de las moléculas de bajo peso molecular aprobadas por la FDA entre 1981 y 2014 no son moléculas sintéticas, sino en su mayoría productos naturales o moléculas directamente derivadas de ellos (125).

La construcción de librerías químicas inspiradas en la biodiversidad molecular, terrestre y/o marina, es una estrategia eficiente para identificar moléculas originales con aplicaciones biomédicas. Posteriormente, el cribado mixto de esas quimiotecas es una estrategia potente para identificar dianas relacionadas con enfermedades y establecer puntos de partida adecuados para el descubrimiento de nuevos fármacos. En este sentido, el conocimiento de las dianas terapéuticas que rigen la biología tumoral de ciertos cánceres, como puede ser BCR-ABL en leucemia mieloide crónica (143) o los ER en cáncer de mama ER+ (144,145) facilitan el diseño racional de nuevos compuestos. Estas moléculas están inspiradas en las estructuras privilegiadas de productos



## I. INTRODUCCIÓN

naturales, lo que aumenta considerablemente la posibilidad de éxito. Al respecto, cabe destacar que el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral tiene una dilatada experiencia, ya que, en los últimos años, se han identificado compuestos de distinta naturaleza incluyendo chalconas, híbridos naftoquinona-cumarina, pirazoles, lignanos o pirrolidonas con potencialidad antitumoral (144–148) y/o antiestrogénica en diferentes tipos de cáncer (144,149,150).

Para que la creación de quimiotecas sea posible, se requiere la implementación de herramientas de síntesis química como: la síntesis orientada biológicamente (BIOS), síntesis orientada a la diversidad (SOD) y síntesis orientada a la diversidad basada en estructuras privilegiadas (pSOD) (151,152). Para este fin se puede incrementar la complejidad estructural haciendo uso de reacciones dominó y multicomponentes (153,154) apoyadas en estudios de *docking* molecular y cribado *in silico*. El concepto de farmacóforo como una molécula con un conjunto de propiedades químicas asociadas a actividades biológicas determinadas permite, adicionalmente, diseñar compuestos potentes con significativos datos SAR e identificar el mejor perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) (155). Otras técnicas computacionales como el modelado molecular son especialmente útiles al basarse en la estructura tridimensional de la diana biológica (*Structural based Drug Design-SBDD*) o del ligando de unión (*Ligand based Drug Design-LBDD*). La técnica SBDD provee un análisis de la afinidad y las interacciones de los compuestos con la diana molecular, mientras que LBDD se focaliza en la diversidad estructural de los ligandos que podrían interactuar con dianas específicas (156). El conjunto de estrategias anteriores permite acceder de forma bioinspirada y racional a nuevas entidades moleculares más diversas y estructuralmente más complejas que los productos naturales de partida. Además, la generación de análogos permite mejorar las propiedades físico-químicas de las moléculas y factores farmacológicos relevantes como la toxicidad y la potencia (157).

La búsqueda de compuestos antitumorales a partir de librerías de productos naturales permite establecer la hipótesis y los objetivos principales en los que se centra esta Tesis Doctoral.



## **II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

---



## II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El marco teórico de la presente Tesis Doctoral ha puesto de manifiesto la relevancia fisiológica de los ER en humanos y su relación con el cáncer de mama. La hipótesis de partida de este trabajo se basa en que una activación aberrante de los ER motiva el crecimiento, la diferenciación o la supervivencia de los tumores de mama ER+. A pesar de ser uno de los cánceres que tienen un mejor pronóstico y tratamiento clínico, el cáncer de mama ER+ presenta dificultades terapéuticas relacionadas con la pérdida de eficacia de los tratamientos, la generación de resistencia endocrina, la elevada toxicidad o los efectos adversos indeseables tales como los efectos uterotróficos registrados con muchos de los SERMs empleados en la terapéutica actual. Todo ello justifica la necesidad de encontrar nuevas entidades químicas eficaces, capaces de inhibir/modular la actividad de los ER y de superar los obstáculos que se presentan en el tratamiento actual, en el contexto de esta patología.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el **objetivo principal** del presente proyecto de tesis consiste en la búsqueda, identificación, caracterización y evaluación farmacológica preclínica de nuevos compuestos antitumorales con potencialidad SERM/SERD en el contexto del cáncer de mama ER+. Para ello, se plantea seguir una estrategia de combinación de las herramientas de cribado farmacológico PDD y TDD, usando como diana el ER, a partir de distintas quimiotecas de moléculas bioinspiradas en productos naturales. El cribado mixto culmina con el descubrimiento de compuestos antitumorales y antiestrogénicos líderes para los que se pretende caracterizar su mecanismo de acción molecular y sus principales efectos biológicos *in vitro*.

Para lograr el objetivo general de la presente Tesis Doctoral, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Cribar farmacológicamente mediante una estrategia PDD, un conjunto de quimiotecas enriquecidas en moléculas con estructuras químicas privilegiadas de diversa naturaleza, con potencialidad antitumoral en cáncer de mama de cualquier tipología: ER+, HER2+ y TNBC.
2. Cribar farmacológicamente mediante una estrategia mixta (PDD y TDD, basado en la diana terapéutica del ER) varias quimiotecas (PLRx, LGx, PSx) de compuestos con estructuras químicas privilegiadas, en líneas celulares de cáncer de mama ER+ para identificar moléculas con actividad SERM.
3. Investigar los efectos específicos (agonismo-antagonismo) de los productos líderes seleccionados de las quimiotecas, en relación con su modulación transcripcional ER dependiente en cáncer de mama ER+.
4. Caracterizar la afinidad de unión de los compuestos líderes seleccionados a los ER.



## II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

5. Evaluar las propiedades antitumorales (crecimiento y citotoxicidad) de los compuestos líderes seleccionados en ensayos en 2D y 3D.
6. Determinar las propiedades antiestrogénicas de los compuestos líderes en ensayos en 2D.
7. Describir las propiedades farmacológicas de los compuestos líderes en base a los estudios ADME y las relaciones estructura-actividad (SAR).
8. Caracterizar el mecanismo de acción molecular de los compuestos líderes seleccionados en el contexto de la diana terapéutica de los ER y las rutas de señalización conectadas (otros receptores nucleares como AR o GR; otros factores de transcripción como STAT3/STAT5).
9. Investigar el mecanismo de acción de los compuestos líderes seleccionados en relación con procesos biológicos relevantes (expresión génica, ciclo celular o apoptosis).
10. Validar los efectos antitumorales y específicos de los productos líderes seleccionados en relación con su modulación en otros modelos de cáncer ER+ (cáncer de endometrio).
11. Determinar *in vitro* la citotoxicidad de los compuestos líderes seleccionados en células primarias humanas y células de mama no tumorales. Calcular los índices de citotoxicidad (selectividad).
12. Evaluar *in vitro* la combinación de los compuestos seleccionados y el tratamiento de primera línea de la enfermedad para investigar si existe una posible potenciación del efecto antitumoral.

# **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 1. Librerías químicas (quimiotecas) de estudio

A lo largo de esta sección se describen las principales características de las librerías químicas que fueron investigadas con el fin de identificar nuevas moléculas capaces de actuar como moduladores de los receptores de estrógenos (SERMs/SERDs) y/o con actividad antitumoral en el contexto del cáncer de mama.

### 1.1. Síntesis y caracterización de librerías químicas

El descubrimiento de moléculas originales, inspiradas en motivos estructurales privilegiados de compuestos de la naturaleza fue posible gracias a la íntima colaboración existente entre grupos de investigación multidisciplinares capaces de obtener nuevas moléculas e investigar su actividad biológica. Para los estudios de esta Tesis, se estableció una estrecha colaboración entre los grupos de investigación “Química y Bioactividad de compuestos basados en Productos Naturales – QUIBIONAT”, del Instituto Universitario de Bio-Orgánica (IUBO) “Antonio González”, de la Universidad de la Laguna (ULL, Tenerife, Canarias, España) y “Farmacología Molecular y Traslacional – BIOPharm”, del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (ULPGC, Gran Canaria, Canarias, España).

El grupo QUIBIONAT realizó una búsqueda bioinspirada de nuevos compuestos con actividad biológica en modelos de enfermedad como el cáncer de mama. Tras su síntesis, preparación y caracterización química, los compuestos fueron enviados para su evaluación biológica en forma de liofilizados, que fueron disueltos a una concentración de 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, EE.UU.) con grado de biología molecular en condiciones de esterilidad. Nuestro grupo de investigación, BIOPharm, se encargó de la evaluación biológica de todas las quimiotecas.

### 1.2. Derivados de la embelina con núcleos de pirazol (PMA-Px) o acridina (PMA-Acx)

La serie química de los compuestos nitrogenados derivados de la embelina incluyó 70 moléculas de estudio divididas en dos subcategorías, en función de si la dihidropiridina se fusionó a un núcleo de pirazol (PMA-Px, 38 compuestos) (**Tabla 2**) o de acridina (PMA-Acx, 32 moléculas heterocíclicas) (**Tabla 3**) (158). La embelina es una benzoquinona natural (**Figura 21**) aislada de la planta *Embelia ribes* para la que se han descrito actividades biológicas antiinflamatorias y antitumorales (159). Ciertas modificaciones químicas de la embelina, especialmente en reacciones multicomponentes, ya habían permitido la síntesis de compuestos con actividad antitumoral en cáncer de mama (160–162), incluyendo una publicación de nuestro grupo (148).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 2. Relación de compuestos de la quimioteca de derivados de la embelina con núcleos de tipo pirazol (PMA-Px).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PMA-P1	523,67	6,3	50	241
PMA-P2	513,63	4,3	50	167
PMA-P3	531,73	1,7	50	64
PMA-P4	567,67	5,3	50	187
PMA-P5	571,68	4,5	50	157
PMA-P6	541,66	4,4	50	162
PMA-P7	583,72	3,3	50	113
PMA-P8	602,56	4,7	50	156
PMA-P9	568,66	3,7	50	130
PMA-P10	558,11	5,5	50	197
PMA-P11	503,68	3,1	50	123
PMA-P12	475,62	3,0	50	126
PMA-P13	529,71	2,0	50	76
PMA-P14	591,66	4,8	50	162
PMA-P15b	566,73	4,2	50	148
PMA-P16a	566,73	4,4	50	155
PMA-P16b	524,65	2,7	50	103
PMA-P17	541,66	3,8	50	140
PMA-P18	567,67	3,0	50	106
PMA-P19	581,7	4,8	50	165
PMA-P20	548,67	3,6	50	131
PMA-P21	568,66	4,6	50	162
PMA-P22	524,65	4,0	50	152
PMA-P23	549,58	3,9	50	142
PMA-P24	521,53	3,5	50	134
PMA-P25	493,48	3,7	50	150
PMA-P26	442,42	3,6	50	163
PMA-P27	625,11	4,0	50	128
PMA-P28	670,56	3,6	50	107
PMA-P29	609,65	4,4	50	144
PMA-P30	609,65	4,3	50	141
PMA-P31	634,73	3,9	50	123
PMA-P32	581,63	4,7	50	162
PMA-P33	529,59	4,1	50	155
PMA-P34	621,69	4,8	50	154
PMA-P35	589,65	3,1	50	105
PMA-P36	605,69	3,7	50	122

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

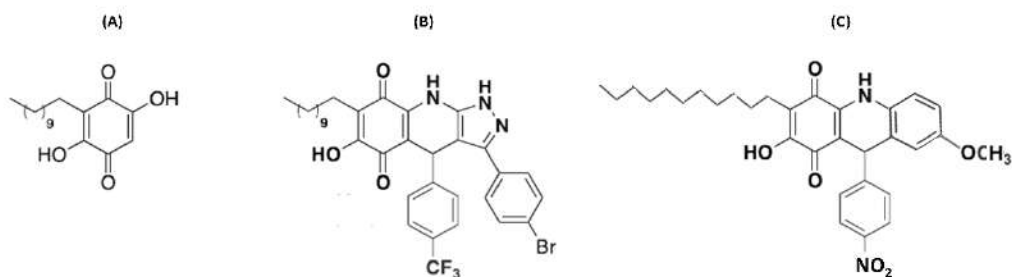


Figura 21. Estructura química de la (A) embelina y sus derivados (B) PMA-P29, con un núcleo de pirazol, y (C) PMA-Ac12 con un núcleo aromático de tipo acridina.

Tabla 3. Relación de compuestos de la quimioteca de derivados de la embelina con núcleos de tipo acridina (PMA-Acx).

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (μl)
PMA-Ac1	457,6	2,3	50	101
PMA-Ac2	536,5	3,0	50	112
PMA-Ac3	492,05	3,8	50	154
PMA-Ac4	475,59	3,8	50	160
PMA-Ac5	502,60	4,0	50	159
PMA-Ac6	475,59	3,2	50	135
PMA-Ac7	485,66	3,3	50	136
PMA-Ac8	517,66	2,6	50	100
PMA-Ac9	515,64	3,3	50	128
PMA-Ac10	463,63	3,5	50	151
PMA-Ac11	475,59	3,2	50	135
PMA-Ac12	532,63	4,1	50	154
PMA-Ac13	581,50	3,2	50	110
PMA-Ac14	455,59	2,2	50	97
PMA-Ac15	534,48	3,3	50	123
PMA-Ac16	490,03	3,3	50	135
PMA-Ac17	473,58	3,1	50	131
PMA-Ac18	473,58	2,6	50	110
PMA-Ac19	483,64	3,9	50	161
PMA-Ac20	515,64	2,0	50	78
PMA-Ac21	500,48	2,5	50	100
PMA-Ac22	513,62	2,9	50	113
PMA-Ac23	461,62	3,8	50	165
PMA-Ac24	528,64	6,3	50	477
PMA-Ac25	530,61	3,4	50	128
PMA-Ac26	473,58	2,0	50	84
PMA-Ac27	369,50	2,9	50	157
PMA-Ac28	397,55	2,1	50	106
PMA-Ac29	399,52	2,2	50	110
PMA-Ac30	414,49	2,0	50	97
PMA-Ac31	448,39	3,4	50	152
PMA-Emb	294,00	2,4	50	163

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (μl) en la correspondiente dilución con DMSO.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.3. Compuestos espirodímeros (SPx)

La quimioteca de compuestos espirodímeros incluyó 47 compuestos derivados de la 1-indanona (**Tabla 4**). Esta molécula de origen sintético ha sido utilizada multidisciplinariamente en campos diversos como la medicina, la agricultura o la química al poseer diversas actividades biológicas: antivírica, antimalárica, antibacteriana, antitumoral, analgésica y antiinflamatoria (163,164).

**Tabla 4. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo espirodímeros (SPx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
SP-1	440,0	5,5	50	250
SP-2	468,0	5,1	50	218
SP-3	524,0	4,2	50	160
SP-4	500,0	4,6	50	184
SP-5	476,0	4,6	50	193
SP-6	476,0	4,3	50	181
SP-7	476,0	3,8	50	160
SP-8	509,0	4,8	50	189
SP-9	598,0	4,7	50	157
SP-10	576,0	4,4	50	153
SP-11	560,0	4,4	50	157
SP-12	560,0	4,4	50	157
SP-13	530,0	4,3	50	162
SP-14	420,0	3,8	50	181
SP-15	490,0	4,6	50	188
SP-16	620,0	4,5	50	145
SP-17	536,0	4,8	50	179
SP-18	528,0	4,2	50	159
SP-19	620,0	3,9	50	126
SP-20	496,0	4,2	50	169
SP-21	418,0	3,6	50	172
SP-22	420,0	4,6	50	219
SP-23*	526,0	4,3	10	817
SP-24	520,0	4,6	50	177
SP-25	552,0	5,1	50	185
SP-26	530,0	4,0	50	151
SP-27	452,0	5,0	50	221
SP-28	452,0	4,0	50	177
SP-29	668,0	3,7	50	111
SP-30	600,0	5,1	50	170
SP-31	542,0	3,2	50	118
SP-32	560,0	4,1	50	146
SP-33	472,0	4,2	50	178
SP-34	656,0	4,9	50	299
SP-35	442,0	4,5	50	204
SP-36	442,0	4,5	50	204
SP-37	442,0	4,7	50	213
SP-38	560,0	3,7	50	132
SP-39	718,0	3,8	50	106

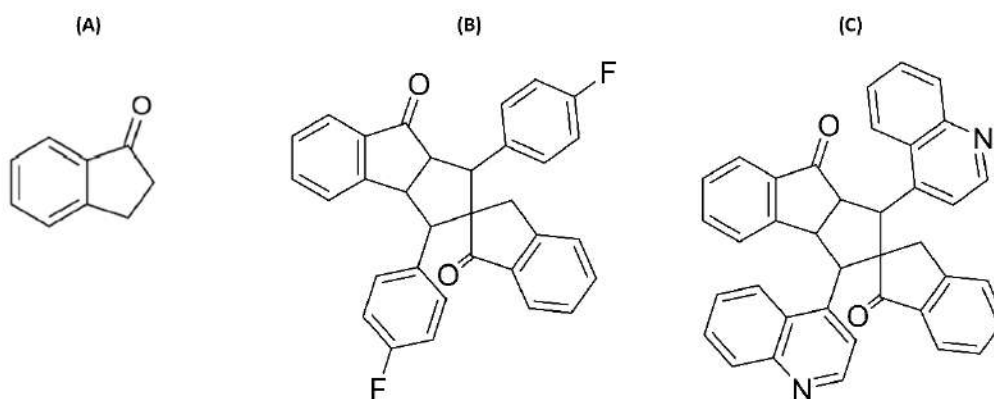
### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 4 (continuación). Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo espirodímeros (SPx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol ( $\mu$ l)
SP-40	620,0	5,0	50	161
SP-41	500,0	3,6	50	144
SP-42	658,0	4,2	50	128
SP-43	560,0	4,6	50	164
SP-44	598,0	4,6	50	154
SP-45	756,0	4,6	50	122
SP-46	658,0	3,7	50	112
SP-47	504,0	3,7	50	147

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros ( $\mu$ l) en la correspondiente dilución con DMSO.

Los espirodímeros se generaron mediante la condensación de la 1-indanona y aldehídos aromáticos (**Figura 22**).



**Figura 22.** Estructura química de la (A) 1-indanona y dos de sus derivados espirodímeros: (B) Sp-5 y (C) Sp-31.

#### 1.4. Compuestos basados en complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx)

Esta librería química constó de 31 compuestos basados en complejos metálicos, que llevaban asociados ligandos tipo chalconas o naftoquinonas como el lapachol (**Tabla 5**). La diversidad en los compuestos se logró combinando diferentes metales como manganeso (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co) o zinc (Zn). Los metales son utilizados para proporcionar mayor número de geometrías de coordinación, organizando tridimensionalmente los ligandos orgánicos. Además del papel estructural, los metales pueden participar en la actividad de un compuesto mediante procesos de activación redox (165). Desde el punto de vista químico, las chalconas constituyen cetonas aromáticas, mientras que el lapachol se define como una naftoquinona de origen natural



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

obtenida de la corteza de ciertos árboles de la familia *Bignoniaceae* (**Figura 23**). Tanto chalconas como lapachol se asocian con múltiples actividades biológicas: antitumoral, antibiótica, antimalárica, tripanocida y leishmanicida, entre otras (145,166). La actividad farmacológica del lapachol se debe fundamentalmente a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) (167), mientras que los metales asociados a las chalconas parecen mejorar su eficacia biológica en células de cáncer de mama, tal y como demuestra una publicación de nuestro grupo (145).

**Tabla 5. Relación de compuestos de la quimioteca de complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
NQ	268,1	5,1	50	380
NQCu(1)	633,7	4,4	50	139
NQNi(1)	628,7	4,0	50	127
NQZn(1)	635,4	5,2	50	164
NQMn(1)	624,9	5,0	50	160
NQCo(1)	633,5	4,5	50	142
NQCu(2)	597,7	4,6	50	154
Cuphen	778,3	4,0	50	103
Niphen	775,0	3,3	50	85
Znphen	781,6	3,8	50	97
Mnphen	789,2	3,4	50	86
Cophen	775,3	4,1	50	106
JG-1	256,3	3,8	50	297
JG-2	268,3	2,9	50	216
JG-3	254,2	2,5	50	197
JG-4	270,2	1,5	50	111
T-CH1-Cu	526,0	1,5	50	57
CH6-Cu	727,9	6,1	50	168
CH2-Cu	491,5	5,4	50	439,5
CH6-Ru	640,5	6,9	50	215
CH3-Cuphen	474,0	6,6	50	278
CH2-Ru	527,5	1,6	50	61
Cu-Lap	727,0	9,1	50	250
Co-Lap	947,8	2,5	50	53
[Cu(phen)(lap)2: CH2Cl2	727,0	4,2	50	116
CH8-Cu	580,0	2,8	50	97
CH10-Cu	635,1	6,6	50	208
CH9-Cu	571,5	9,7	50	339
Co-1	947,8	2,7	50	57
Co	947,8	28,0	50	591
CH3-Cu	524,1	6,5	50	248

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.

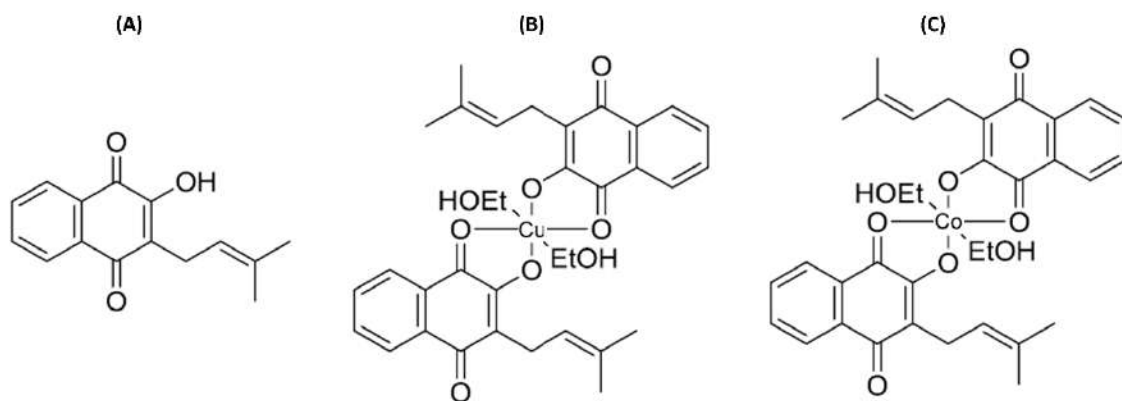


Figura 23. Estructura química del (A) lapachol y dos derivados basados en la creación de complejos orgánicos ligados a metales de cobre y cobalto, respectivamente: (B) Cu-Lap y (C) Co-Lap.

### 1.5. Compuestos análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx)

Las naftoquinonas son productos naturales derivados de plantas con elevado interés clínico. Entre las más conocidas, destacan compuestos como la juglona, lawsona y plumbagina, cuyas propiedades antitumorales, citotóxicas, antibacterianas, antifúngicas, antivíricas, antiinflamatorias y antipiréticas han sido ampliamente estudiadas (146,168). De esta forma, se prepararon una serie de productos por reacciones multicomponente, al fusionar un esqueleto naftoquinónico con 4-hidroxycumarina en una reacción catalizada por el tricloruro de indio (**Figura 24**) (147,169). Como antecedente relevante, cabe destacar que nuestro grupo de investigación identificó el compuesto NPQ-C6 como líder de una serie de compuestos híbridos naftoquinona-cumarina por sus actividades antitumorales en leucemia mieloide crónica y cáncer de mama ER+, entre otros tipos de cáncer (170). Este producto sirvió como punto de partida para la síntesis de una quimioteca de 48 análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx) (**Tabla 6**). Las propiedades químicas de estos compuestos posibilitan su interacción covalente con múltiples dianas terapéuticas (147).

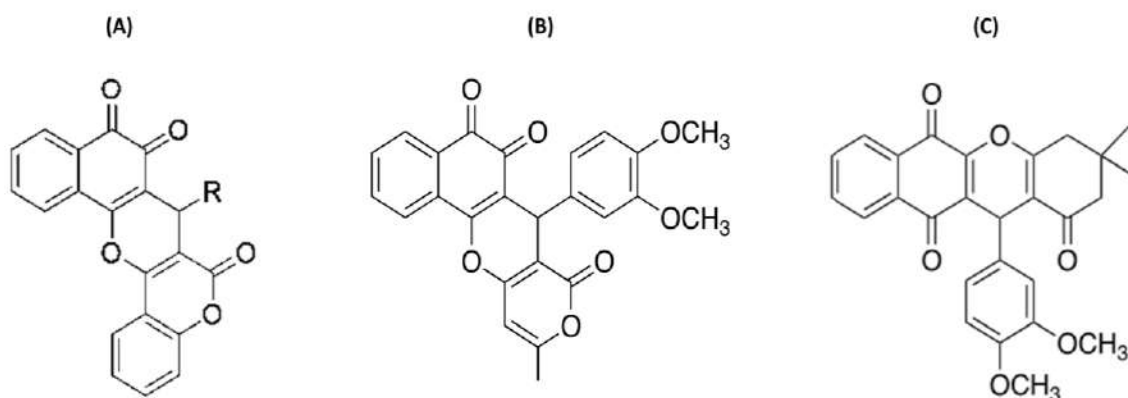


Figura 24. Estructura química del (A) esqueleto estructural del híbrido naftoquinona-cumarina (170) y dos de sus análogos modificados: (B) JKST-6 y (C) JKST-13.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 6. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a análogos de un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
JKST-1	478,45	6,0	50	251
JKST-2	478,45	4,4	50	184
JKST-3	458,46	3,5	50	153
JKST-4	458,46	5,8	50	253
JKST-5	458,46	6,0	50	262
JKST-6	430,41	4,2	50	195
JKST-7	436,41	4,6	50	211
JKST-8	448,42	4,3	50	192
JKST-9	436,41	6,0	50	275
JKST-10	448,42	3,7	50	165
JKST-11	416,42	3,5	50	168
JKST-12	416,42	4,2	50	202
JKST-13	444,48	4,1	50	184
JKST-14	448,47	6,5	50	290
JKST-15	474,38	5,4	50	228
JKST-16	446,45	4,1	50	184
JKST-17	434,44	4,1	50	189
JKST-18	418,40	3,5	50	167
JKST-19	462,41	4,5	50	195
JKST-20	450,40	4,8	50	213
JKST-21	538,50	3,2	50	119
JKST-22	496,46	4,8	50	193
JKST-23	466,41	3,2	50	137
JKST-24	454,40	4,0	50	176
JKST-25	496,46	3,8	50	153
JKST-26	538,5	3,6	50	134
JKST-27	496,46	4,5	50	181
JKST-28	538,50	4,3	50	160
JKST-29	191,14	2,6	50	272
JKST-30	236,18	3,0	50	254
JKST-31	164,11	2,8	50	341
JKST-32	252,24	3,2	50	254
JKST-33	180,18	3,1	50	344
JKST-34	178,18	4,0	50	449
JKST-35	425,43	3,5	50	165
JKST-36	204,18	4,2	50	411
JKST-37	204,18	4,5	50	441
JKST-38	204,18	3,5	50	343
JKST-39	458,37	2,1	50	92
JKST-40	456,4	2,4	50	105
JKST-41	490,5	2,3	50	94
JKST-42	472,47	4,0	50	169
JKST-43	486,51	4,1	50	337
JKST-44	488,53	3,6	50	147
JKST-45	472,49	4,5	50	190

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

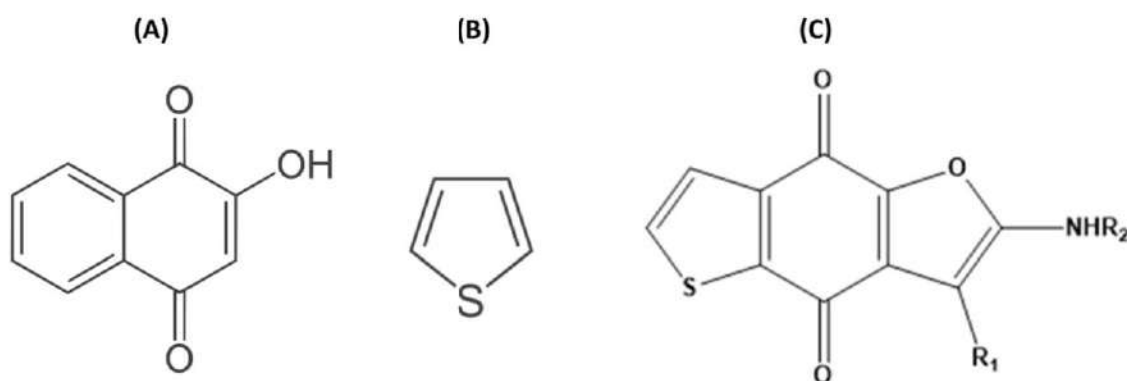
**Tabla 6 (continuación). Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a análogos de un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (μl)
JKST-46	516,58	1,2	50	46
JKST-47	508,52	3,0	50	118
JKST-48	500,54	2,0	50	80

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (μl) en la correspondiente dilución con DMSO.

#### 1.6. Compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridinona (Pym-1)

Las quinonas son compuestos orgánicos comunes en la naturaleza, con un papel fisiológico relevante en plantas y animales. Dadas sus numerosas propiedades biológicas (antitumoral, antibacteriana, antimalárica, fungicida) y sus características estructurales, se consideran estructuras privilegiadas en el ámbito de la química médica (171). La lawsona constituye una de estas moléculas con múltiples actividades biológicas, que han sido ampliamente descritas por diversos grupos, incluyendo QUIBIONAT (172). De hecho, utilizando la estructura de la lawsona (**Figura 25**), y tomando como referencia la estrategia de síntesis descrita por el mencionado grupo (171), se preparó una quimioteca de 21 compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) (**Tabla 7**). Estos compuestos se definen químicamente como quinonas heterocíclicas que incluyen un anillo de tiofeno de cinco miembros y un anillo oxigenado de furano en su esqueleto. Se originaron a partir de un primer compuesto con una estructura molecular de 2-amino-tieno-[2,3-f]-benzofurano-4,8-dionas, para la que se determinó una actividad como inhibidor multiquinasa. Sus propiedades antitumorales actuando como inhibidores de proteínas intracelulares JAK/STAT, ya habían sido descritas previamente por Clark y colaboradores en un trabajo del año 2014 (173).



**Figura 25. Estructuras químicas de (A) la quinona heterocíclica lawsona (172), (B) un anillo de tiofeno y (C) el esqueleto básico de un producto PFX.**

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 7. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a quinonas con anillo de tiofeno (PFx) y una molécula de tipo quinona con anillo de pirimidina (Pym-1).

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PF-1	396,42	2,5	50	126
PF-2	419,42	4,5	50	215
PF-3	385,86	4,9	50	254
PF-4	430,32	4,7	50	218
PF-5	369,41	6	50	325
PF-6	351,42	4,1	50	233
PF-7	381,45	4,6	50	241
PF-8	317,4	5,6	50	353
PF-9	357,47	4,2	50	235
PF-10	352,41	4,7	50	267
PF-11	357,44	6,8	50	380
PF-12	396,42	2,9	50	146
PF-2.1	422,46	4,5	50	213
PF-2.6	377,46	2,7	50	143
PF-2.7	407,48	4,7	50	231
PF-2.8	343,44	3,8	50	221
PF-3.1	430,43	2,6	50	121
PF-3.6	385,44	6,4	50	332
PF-3.7	415,46	5,9	50	284
PF-3.8	351,42	7,4	50	421
PF-4.3	329,75	1,7	50	103
Pym-1	396,82	3,5	50	176

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.

Junto a la serie PFx se evaluó un único compuesto quinónico al que se le sustituyó el anillo de tiofeno por un anillo de piridinona (2-piridona), con el objetivo de obtener una actividad antitumoral destacada y sintetizar una serie química completa a partir de modificaciones en R1 y R2 del motivo estructural furano-quinona de la molécula (**Figura 26**).

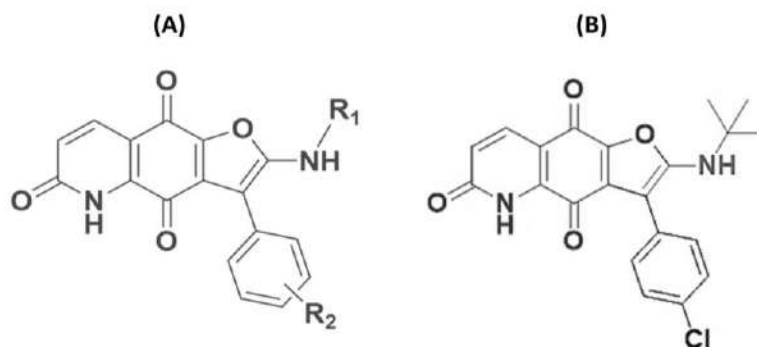


Figura 26. Estructura química del esqueleto estructural de la (A) furano-quinona y su producto derivado (B) Pym-1.



**1.7. Compuestos de tipo antraquinonas (PCKx)**

La quimioteca de compuestos PCKx estuvo formada por un conjunto de 31 productos (Tabla 8) de tipo antraquinonas (Figura 27). Constituyen estructuras privilegiadas con un amplio rango de actividades biológicas conocidas: antitumoral, antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana, anti-VIH. En lo referente a la actividad antitumoral, las antraquinonas más conocidas son la quinalizarina y la emodina (174). Sobre esta última, existen evidencias que han identificado actividad antitumoral en cáncer de mama (175).

**Tabla 8. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo antraquinonas (PCKx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PCK-1	208,21	5,3	50	509
PCK-2	223,22	2,5	50	224
PCK-3	253,2	4,1	50	324
PCK-4	224,21	6,4	50	1142
PCK-5	517,63	5,7	50	220
PCK-6	222,23	5,3	50	477
PCK-7	222,23	5,4	50	486
PCK-8	278,34	3,6	50	259
PCK-9	290,35	2,8	50	193
PCK-10	293,36	5,5	50	375
PCK-11	293,36	5,0	50	341
PCK-12	323,34	5,5	50	340
PCK-13	323,34	1,9	50	118
PCK-14	294,34	4,6	50	313
PCK-15	294,34	4,0	50	272
PCK-16	308,37	5,4	50	350
PCK-17	308,37	1,9	50	123
PCK-18	237,25	3,5	50	295
PCK-19	267,23	5,4	50	404
PCK-20	237,25	5,3	50	447
PCK-21	238,23	6,3	50	529
PCK-22	238,23	4,0	50	336
PCK-23	252,26	4,8	50	381
PCK-24	252,26	5,3	50	420
PCK-25	335,35	4,1	50	245
PCK-26	305,37	2,2	50	144
PCK-27	237,25	1,8	50	152
PCK-28	237,25	3,9	50	329
PCK-29	267,23	4,4	50	329
PCK-30	306,35	2,2	50	144
PCK-31	320,38	5,8	50	362

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

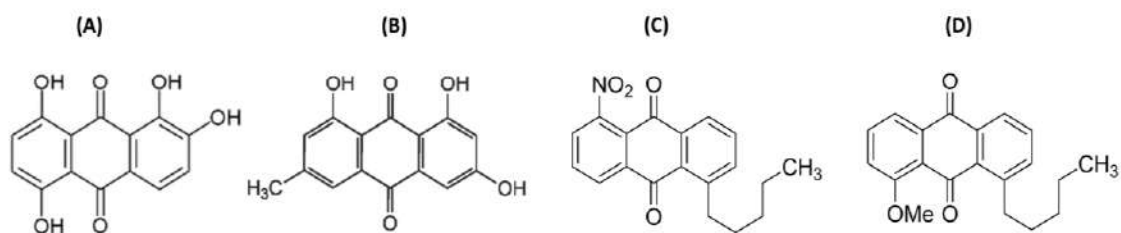


Figura 27. Estructura química de la (A) quinalizarina, la (B) emodina y dos derivados antraquinónicos: (C) PCK-13 y (D) PCK-16.

#### 1.8. Compuestos análogos simplificados de la marmicina A (MARx)

Los 8 productos que conformaron esta quimioteca, abreviada como MARx (Tabla 9), se refieren a análogos simplificados de la marmicina A, un producto natural aislado de bacterias del género *Streptomyces*. Desde el punto de vista químico, la marmicina A es una anguciclina con estructura de tipo antraquinona que incorpora un monosacárido (antraquinona glicosilada) (Figura 28). Se ha descrito su notable actividad antiproliferativa en células cancerosas (176).

Tabla 9. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a análogos simplificados de la marmicina A (MARx).

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (μl)
MAR-1	377,39	2,5	50	132
MAR-2	349,38	2,2	50	126
MAR-3	391,41	6,3	50	322
MAR-4	335,35	2,7	50	161
MAR-5	447,52	3,1	50	139
MAR-6	405,48	2,3	50	113
MAR-7	447,52	2,3	50	103
MAR-8	405,48	4,6	50	227

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (μl) en la correspondiente dilución con DMSO.

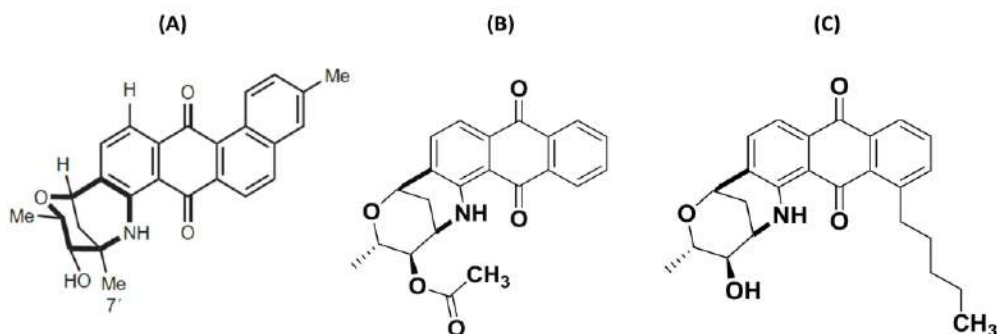


Figura 28. Estructura química de la (A) marmicina A y dos de sus análogos simplificados: (B) MAR-1 y (C) MAR-6.



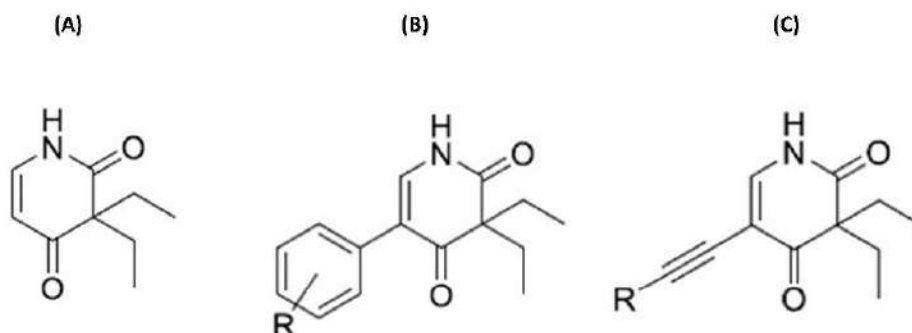
### 1.9. Compuestos derivados de la piritildiona (Rx-Pyr)

La quimioteca de compuestos Rx-Pyr estuvo constituida por 16 productos (Tabla 10) derivados de la piritildiona (Figura 29), conocida comercialmente como *Presidon* o *Persedon*. Se trata de un fármaco psicoactivo descubierto en 1949, que mostró tener efectos hipnótico-sedantes con aparente menor toxicidad que los barbitúricos y que hoy en día está en desuso (177,178). Recientemente, la piritildiona se ha investigado en estudios de reposicionamiento de fármacos con interés antitumoral en próstata y leucemia (179).

**Tabla 10. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas derivadas de la piritildiona (Rx-Pyr).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (μl)
R1	293,10	4,6	50	314
R2	263,41	2,2	50	167
R3	273,33	4,2	50	307
R4	268,31	4,7	50	350
R5	243,30	3,5	50	288
R6	249,33	3,2	50	257
R8	259,30	4,4	50	339
R9	191,23	5,7	50	596
R11	340,38	2,0	50	118
R12	267,32	3,5	50	262
R16	292,33	3,8	50	260
Pyr	167,21	4,8	50	574

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (μl) en la correspondiente dilución con DMSO.



**Figura 29. Estructura química de la (A) piritildiona y los dos tipos de compuestos derivados de la misma: (B) derivados 5-aryl piritildiona y (C) derivados 5-etil piritildiona.**

**1.10. Compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx)**

La quimioteca de compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx) incluyó 41 compuestos (**Tabla 11**) diseñados, preparados y aislados a partir de chalconas y fenilhidrazinas. Los pirazoles son compuestos orgánicos que contienen un anillo aromático heterocíclico con tres átomos de carbono y dos de nitrógeno en posiciones adyacentes. Estos productos han llamado la atención por sus interesantes propiedades biológicas, con especial mención a su potencial antitumoral y citotóxico, y su enorme diversidad estructural (180). En la serie PSx se encuentran moléculas con un núcleo pirazólico de la que parten tres grupos arilo en posiciones 1, 3 y 5 (**Figura 30**). Estructuralmente se relacionan con el 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT), que constituye un agonista selectivo del ER $\alpha$  que previene de la pérdida ósea y la ganancia de peso uterino consecuencia de la ovariectomía (181).

**Tabla 11. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo 1,3,5-triarilpirazoles sustituidos (PSx).**

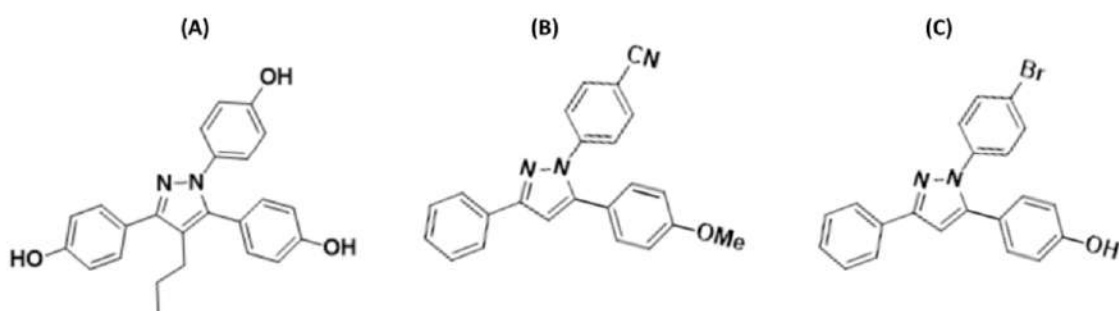
ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol ( $\mu$ l)
PS-1	405,30	5,7	50	281
PS-2	375,27	6,3	50	336
PS-3	321,38	5,5	50	342
PS-4	296,37	6,6	50	445
PS-5	419,28	5,3	50	253
PS-6	405,30	4,8	50	237
PS-7	326,40	5,4	50	331
PS-8	351,41	3,5	50	199
PS-9	351,41	6,5	50	370
PS-10	391,27	6,0	50	307
PS-11	407,27	4,4	50	216
PS-12	328,37	4,8	50	292
PS-13	381,44	5,8	50	304
PS-14	326,40	4,1	50	251
PS-15	356,43	5,8	50	325
PS-16	435,32	5,6	50	257
PS-17	407,27	5,2	50	255
PS-18	312,37	5,2	50	333
PS-19	365,39	6,8	50	372
PS-20	312,37	4,3	50	275
PS-21	391,27	5,4	50	276
PS-22	340,38	4,6	50	270
PS-23	353,38	3,4	50	192
PS-24	337,38	5,2	50	308
PS-25	337,38	2,6	50	154
PS-26	421,29	5,1	50	242
PS-27	367,41	5,8	50	316
PS-28	342,40	5,5	50	321
PS-29	298,39	4,6	50	308
PS-30	323,40	1,8	50	111
PS-31	377,29	6,1	50	323

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 11 (continuación). Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo 1,3,5-triarilpirazoles sustituidos (PSx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PS-32	328,42	6,3	50	384
PS-33	353,43	4,8	50	272
PS-34	407,31	5,4	50	265
PS-35	328,42	1,8	50	110
PS-36	353,43	6,8	50	385
PS-37	407,31	4,8	50	236
PS-38	358,44	4,7	50	262
PS-39	383,45	5,3	50	276
PS-40	437,34	4,0	50	183
PS-41	353,38	3,7	50	209

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.



**Figura 30. Estructura química del (A) PPT y dos moléculas de tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos de la serie PSx: (B) PS-9 y (C) PS-21.**

#### 1.11. Compuestos derivados de lignanos (LGx)

Esta serie química se refiere a compuestos derivados de lignanos naturales tipo dibencil-butirilactonas (LGx). En concreto, se sintetizaron 16 compuestos (**Tabla 12**) a partir de bursehemina y dimetil-éter matairesinol, dos conocidas dibencil-butirilactonas (**Figura 31**) aisladas de la planta endémica canaria *Bupleurum salicifolium*. Los lignanos y sus derivados químicos constituyen un amplio grupo de productos naturales sintetizados en la ruta del ácido sikímico (182). Exhiben una amplia gama de actividades biológicas, entre las que se encuentran la antitumoral, antivírica, antimitótica, antiinflamatoria, hipolipidémica y estrogénica. Algunas de ellas han sido descritas en publicaciones previas del grupo QUIBIONAT (144,183). Cabe destacar la consideración de estos compuestos como SERMs naturales, ya que existen referencias de sus efectos estro- y antiestrogénicos específicos sobre el dominio *Ligand Binding Domain* (LBD) de los ER en competición con E2 (54).

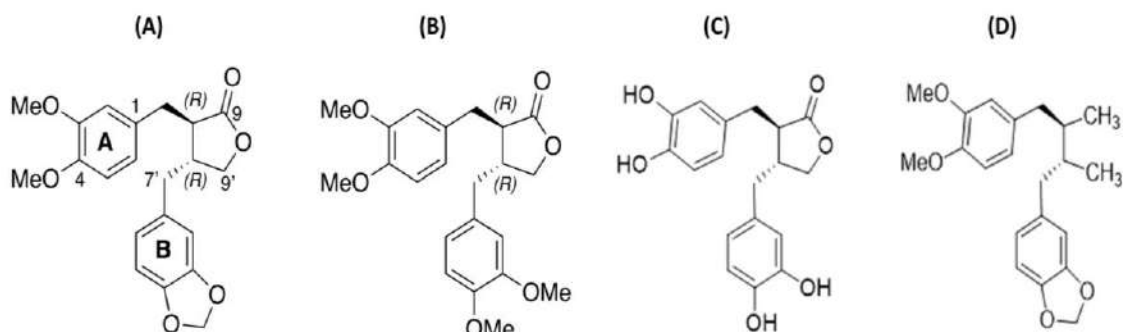


### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 12. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a derivados de lignanos (LGx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (μl)
LG-1	370,4	8,1	50	437
LG-2	386,4	7,8	50	404
LG-3	358,4	5,7	50	318
LG-4	330,3	9,0	50	545
LG-5	372,4	7,7	50	414
LG-6	530,6	7,3	50	275
LG-7	374,4	5,9	50	315
LG-8	356,4	4,2	50	236
LG-9	342,4	4,0	50	234
LG-10	330,4	8,3	50	502
LG-11	344,4	7,0	50	406
LG-12	356,4	5,7	50	320
LG-13	328,3	6,4	50	390
LG-14	388,5	5,2	50	268
LG-15	390,5	6,6	50	338
LG-16	372,5	1,7	50	91

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (μl) en la correspondiente dilución con DMSO.



**Figura 31. Estructura química de las dibencil-butyrolactonas (A) bursehernina y (B) dimetil-éter matairesinol a partir de las que se sintetizaron derivados semisintéticos, como, por ejemplo, (C) LG-4 y (D) LG-9.**

#### 1.12. Pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx)

La quimioteca de compuestos tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx) incluyó 68 productos originales (**Tabla 13**) definidos químicamente como 5-hidroxi-3,5-diaril-1,5-dihidro-2,4-pirrol-2-onas (**Figura 32**), cuyo resultado se obtuvo en la reacción química de condensación entre isonitrilos comerciales y compuestos tipo chalconas, en un proceso de irradiación con microondas a 150 °C durante 10 minutos. El rendimiento de esta

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

reacción fue bueno, obteniéndose estructuras con tres puntos de diversidad estructural: dos aportados por las chalconas y el último aportado por el isonitrilo.

Estudios previos han identificado a las pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas como compuestos con actividad farmacológica: antimicrobiana (184), antiinflamatoria (185) y antitumoral (186). La preparación de esta librería química se basó en un trabajo previo conjunto de los grupos QUIBIONAT y BIOPharm. En él, se diseñaron, identificaron y evaluaron biológicamente compuestos con estructura de diaminotriphenilmetanos (C6-C3-C6), a través de estudios SAR, del conocimiento de motivos estructurales de esqueletos químicos biológicamente relevantes y de estudios computacionales de modulación *in silico* (*docking* molecular) basados en la estructura de los ER (187).

**Tabla 13. Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PLR-1	333,42	2,8	50	168
PLR-2	349,42	3,0	50	172
PLR-3	363,45	4,9	50	270
PLR-4	367,87	5,6	50	304
PLR-5	351,41	3,4	50	194
PLR-6	412,32	3,8	50	184
PLR-7	381,44	3,7	50	194
PLR-8	377,43	4,7	50	249
PLR-9	357,40	3,2	50	179
PLR-10	373,40	1,7	50	91
PLR-11	387,43	2,0	50	103
PLR-12	391,85	2,0	50	102
PLR-13	375,39	1,8	50	96
PLR-14	436,30	4,1	50	188
PLR-15	405,42	4,1	50	202
PLR-16	401,41	2,2	50	110
PLR-17	307,39	1,7	50	111
PLR-18	337,41	3,7	50	219
PLR-19	341,83	1,9	50	111
PLR-20	325,38	4,7	50	289
PLR-21	386,28	3,3	50	171
PLR-22	355,40	2,1	50	118
PLR-23	351,40	1,9	50	108
PLR-24	341,40	4,8	50	281
PLR-25	371,43	2,5	50	135
PLR-26	375,85	2,5	50	133
PLR-27	359,39	2,2	50	122
PLR-28	420,30	2,7	50	128
PLR-29	389,42	2,4	50	123
PLR-30	385,41	2,3	50	119
PLR-31	317,42	2,4	50	151



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 13 (continuación). Relación de compuestos de la quimioteca correspondiente a moléculas de tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx).**

ID	PM	Cantidad (mg)	[mM]	Vol (µl)
PLR-32	430,58	3,2	50	149
PLR-33	444,61	2,1	50	94
PLR-34	339,39	4,0	50	236
PLR-35	355,45	2,3	50	129
PLR-36	214,22	1,9	50	177
PLR-37	214,22	2,9	50	271
PLR-38	230,28	2,2	50	191
PLR-39	230,28	2,1	50	182
PLR-40	408,45	3,7	50	181
PLR-41	416,43	5,1	50	245
PLR-42	432,43	3,0	50	139
PLR-43	408,45	3,8	50	186
PLR-44	416,43	3,3	50	158
PLR-45	432,43	3,2	50	148
PLR-46	408,45	3,4	50	166
PLR-47	416,43	3,2	50	154
PLR-48	432,43	4,0	50	185
PLR-49	408,45	3,7	50	181
PLR-50	416,43	1,8	50	86
PLR-51	432,43	3,6	50	167
PLR-52	408,45	4,9	50	240
PLR-53	416,43	3,1	50	149
PLR-54	432,43	3,2	50	148
PLR-55	361,48	3,9	50	216
PLR-56	369,46	3,2	50	173
PLR-57	385,46	4,1	50	213
PLR-58	335,44	3,3	50	197
PLR-59	351,41	3,9	50	222
PLR-60	359,39	4,4	50	245
PLR-61	375,39	4,6	50	245
PLR-62	325,38	3,3	50	203
PLR-63	363,45	3,7	50	204
PLR-64	371,43	4,0	50	215
PLR-65	387,43	2,1	50	108
PLR-66	337,41	3,8	50	225
PLR-67	386,40	3,3	50	171
PLR-68	378,42	3,7	50	196

Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID), su peso molecular (PM), cantidad preparada en términos de peso en miligramos (mg), concentración del stock madre ([mM]) y volumen (Vol) añadido en microlitros (µl) en la correspondiente dilución con DMSO.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

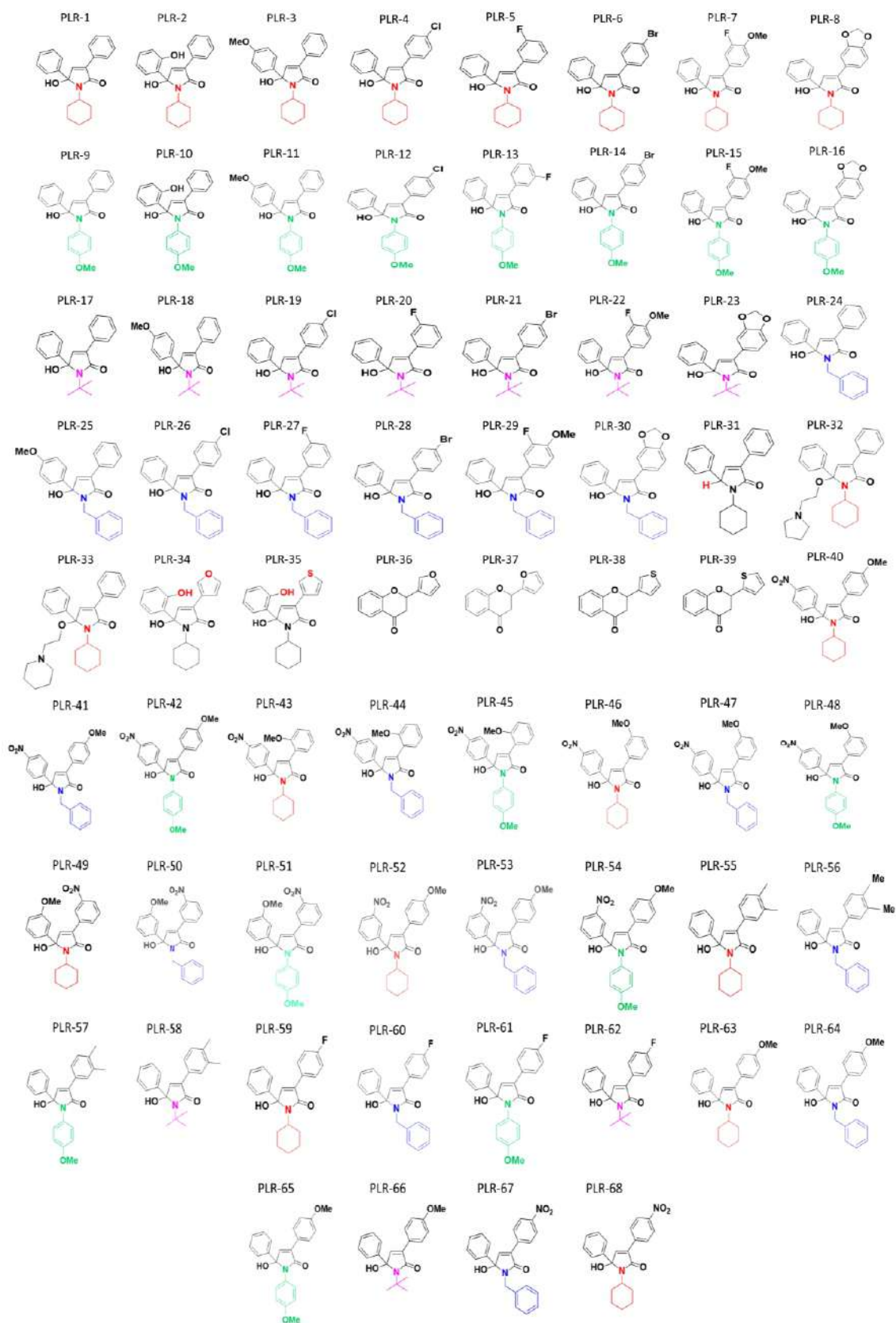
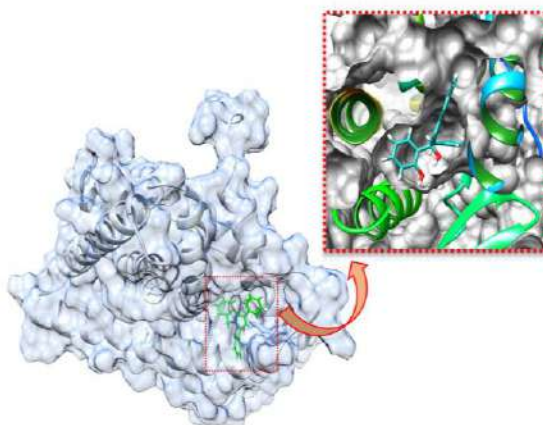


Figura 32. Representación bidimensional de las moléculas pertenecientes a la serie química de los PLRx (5-hidroxi- 3,5-diaril- 1,5-dihidro- 2,4-pirrol- 2-onas).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

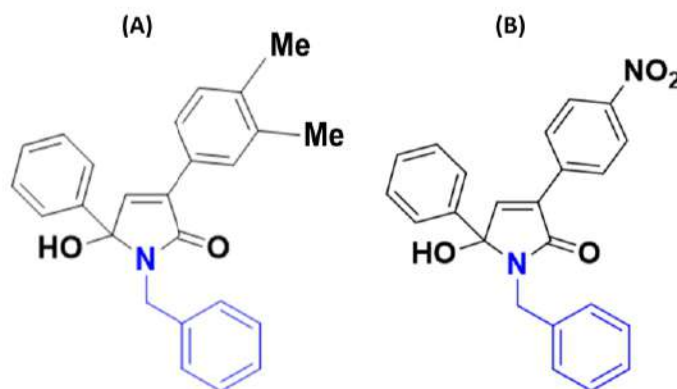
Los productos PLRx se caracterizan de forma genérica por ser altamente hidrofóbicos y presentar anillos aromáticos con distintos sustituyentes. Estos compuestos poseen, como poco, dos anillos aromáticos separados por un núcleo central de 5-hidroxi-2-pirrolidona, normalmente en una orientación de tipo *trans*-estilbeno, que presentan al menos un grupo hidroxilo unido a uno de los anillos. Esto permite emular la estructura química de los estrógenos naturales como el E2 o de otros SERMs como el raloxifeno (**Figura 33**). En algunas moléculas aparece un tercer anillo aromático con una cadena lateral hidrofóbica, que juega un importante rol en el comportamiento antagonista de estos compuestos sobre los ER (188).



**Figura 33.** Representación tridimensional de la visión global y ampliación detallada de un PLR en el bolsillo hidrofóbico del ER $\alpha$  (PDB 3ert).

#### 1.12.1. Compuestos líderes seleccionados de la serie PLRx

El cribado farmacológico mixto llevó a la elección de dos productos líderes de interesantes propiedades farmacológicas (PLR-56 y PLR-67) (**Figura 34**) con respecto al resto de compuestos. PLR-56 y PLR-67, constituyen mezclas racémicas. La existencia de un carbono quiral hace que estas moléculas coexistan al 50 % en forma de sus dos enantiómeros R y S. Los estudios realizados en esta Tesis Doctoral se realizaron con ambos enantiómeros.



**Figura 34.** Estructura química de los compuestos líderes de la serie PLRx: (A) PLR-56 y (B) PLR-67.



## 2. Cultivos celulares

### 2.1 Líneas celulares comerciales

Las líneas celulares utilizadas a lo largo de la presente Tesis (**Tabla 14**) se refieren a clones originales adquiridos de las colecciones celulares de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD, EE. UU.), con la excepción de las células Ishikawa obtenidas de la casa comercial Sigma-Aldrich y las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC), obtenidas de donantes sanos. En la **Figura 35**, se recogen fotografías de algunas de las estirpes celulares de cáncer de mama empleadas.

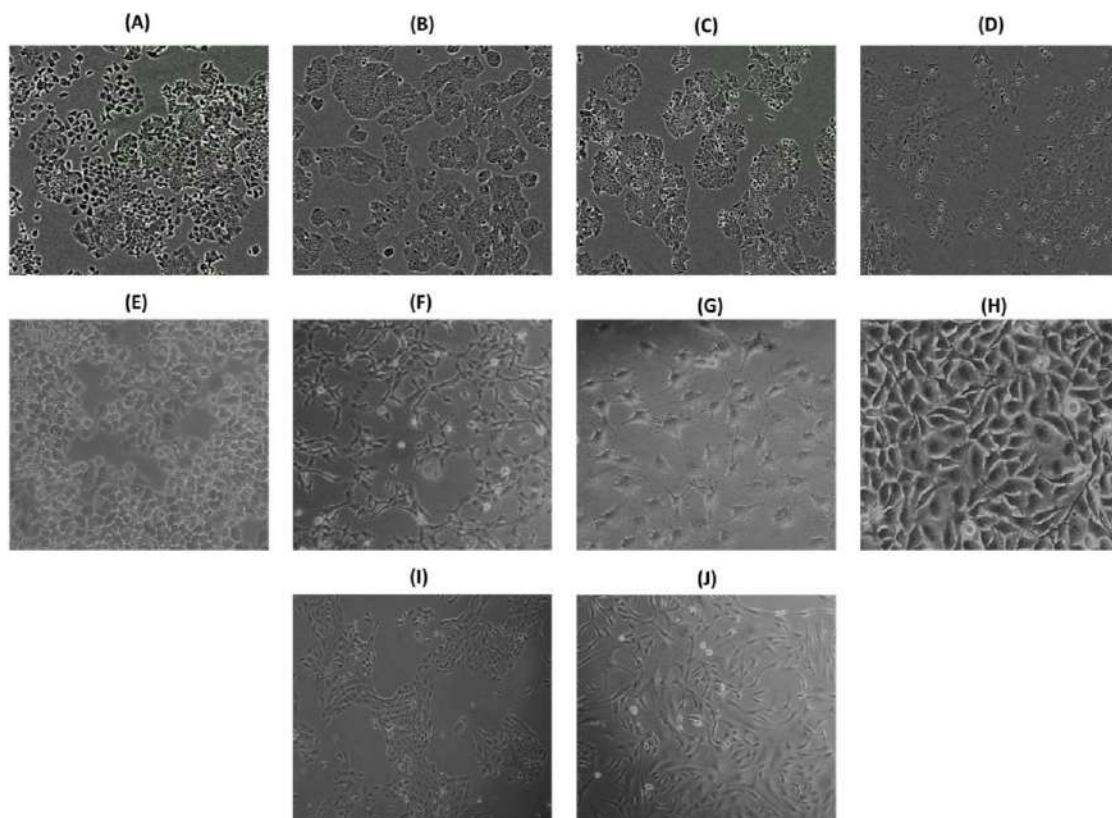
**Tabla 14. Relación de líneas celulares, tipología, origen, medios de crecimiento y suplementos utilizados para su mantenimiento en cultivo.**

Línea celular	Tipo	Origen	Medio de crecimiento	Suplementos
<b>MCF-7</b>	Cáncer de mama (ER+)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 2, 3, 4, 5
<b>MCF-7/BUS</b>	Cáncer de mama (ER+)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 2, 3, 4, 5
<b>T47D</b>	Cáncer de mama (ER+)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 3, 4, 5
<b>T47D-KBluc</b>	Cáncer de mama (ER+)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 2, 3, 4, 5, 9
<b>SK-BR-3</b>	Cáncer de mama (HER2+)	Humano	McCoy's 5A	1, 2, 3, 4, 5
<b>BT-549</b>	Cáncer de mama (TNBC)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 2, 3, 4, 5
<b>MDA-MB-231</b>	Cáncer de mama (TNBC)	Humano	DMEM HG	1, 3, 5
<b>Hs 578T</b>	Cáncer de mama (TNBC)	Humano	DMEM HG	1, 3, 5
<b>Ishikawa</b>	Cáncer de endometrio (ER+)	Humano	MEM w/o rf	1, 3, 5,
<b>HEK293</b>	Células embrionarias de riñón STAT3 Leepoter (TM) Luciferase Reporter cell line	Humano	DMEM HG	1, 2, 3, 5, 8
<b>Ba-F3</b>	Linfocitos B STAT5 Leepoter(TM) Luciferase Reporter cell line	Ratón	RPMI 1640 w/o rf	1, 2, 4, 5, 8, 10
<b>MDA-kb2</b>	Cáncer de mama (AR+, GR+)	Humano	RPMI 1640 w/o rf	1, 3, 5
<b>K562</b>	Leucemia Mieloide Crónica	Humano	RPMI 1640 with rf	1, 3, 5
<b>HEL</b>	Eritroleucemia	Humano	RPMI 1640 with rf	1, 3, 5
<b>HL-60</b>	Leucemia Promielocítica Aguda	Humano	RPMI 1640 with rf	1, 3, 5
<b>Vero</b>	Células no tumorales de riñón	Mono	DMEM HG	1, 3, 5
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangre periférica	Humano	RPMI 1640 with rf	1, 3, 5
<b>RAW 264.7</b>	Macrófagos (Abl-v +)	Ratón	DMEM HG	1, 3, 5
<b>MCF-10A</b>	Células epiteliales no tumorales de glándula mamaria	Humano	Mammary Epithelial Growth Factor Bulletkit	5, 11

De izquierda a derecha se detallan el nombre comercial de la línea celular, el tipo (histológico y tumoral o normal), el origen humano o murino, el medio de crecimiento empleado y los suplementos, cuya identificación es la siguiente: 1) FBS 5-10%, 2) NaPyr 1 mM, 3) L-Glutn 2 mM, 4) HEPES 10 mM, 5) PEST 1 %, 6) *Earl's Salts*, 7) *Non-essential aminoacids*, 8) Puromicina, 9) Geneticina, 10) IL-3 murina 5 ng/mL, 11) Factores de crecimiento especiales para el cultivo de células MCF-10A (*Mammary Epithelial Growth Factor Bulletkit*, que incluye medio basal, extracto pituitario bovino (BPE), hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) e insulina, además de la adición externa de la toxina colérica, (SigmaAldrich, EE. UU.)).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Salvo indicación expresa, todas las células se cultivaron en una atmósfera humidificada, a 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de crecimiento empleados para la experimentación *in vitro* fueron todos de origen comercial, fundamentalmente Biowest (Nuaille, Francia), Corning (NY, EE. UU.) y Lonza (Basilea, Suiza). Los medios fueron genéricamente suplementados con 2mM L-Glutamina (L-Gluta), 1 % Penicilina/ Estreptomicina (PEST) y suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) al 10 %, excepto para las células Ishikawa, cuyo suplemento de FBS fue del 5 %. Para los experimentos de estudio de los efectos estro- y antiestrogénicos específicos de los compuestos químicos de estudio se empleó suero desprovisto de estrógenos con carbón activado (DCC-FBS) (GIBCO – Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.). Algunas líneas celulares requirieron suplementos adicionales de 1 mM piruvato sódico (NaPyr) y 10 mM HEPES, además de la adición de antibióticos de selección (puromicina – SigmaAldrich, EE. UU. y geneticina-G418 – Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) para líneas transfectadas con reporteros de luciferasa. El FBS añadido al cultivo de células HEK293 fue inactivado con calor (30 minutos a 56°C).



**Figura 35. Fotografías de diferentes líneas celulares de cáncer de mama (ER+, HER2+, TNBC), cáncer de endometrio y células no tumorales creciendo sobre la superficie de *flasks* de cultivo celular. Se incluyen líneas celulares inmortalizadas de cáncer de mama ER+: (A) T47D, (B) MCF-7, (C) MCF-7/BUS; cáncer de endometrio ER+: (D) Ishikawa; cáncer de mama HER2+: (E) SK-BR-3; cáncer de mama triple negativo (TNBC) subtipo M: (F) BT-549; cáncer de mama TNBC subtipo MSL: (G) Hs 578T y (H) MDA-MB-231; células no tumorales de mama: (I) MCF-10A; y células no tumorales de riñón de mono: (J) Vero. Imágenes tomadas a 10X aumentos con un microscopio de contraste de fases.**

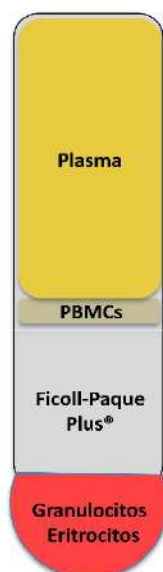


### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el cultivo celular se emplearon “*easy flask*” T75 cm<sup>2</sup> y T25 cm<sup>2</sup>, placas “*multiwell*” y placas P100 de las casas comerciales NUNC (Dinamarca), Thermo Fisher Scientific (EE. UU.) y Corning (NY, EE. UU.). Las células fueron contadas mediante un contador automático ADAM (BioDigital, NY, EE. UU.) y su correspondiente kit de contaje AccuStain Solution/Accuchips (BioDigital); o alternativamente mediante contaje con azul de tripán y el contador automático TC20™ (Bio-Rad, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 2.2 Aislamiento y cultivo de células PBMC

Las células PBMC se aislaron a partir de la sangre de donantes sanos por centrifugación con *Ficoll-Paque Plus*® (Sigma-Aldrich, Merck Millipore) siguiendo la técnica de separación por gradiente de densidad (189). Para ello, se extrajeron cerca de 40 ml de sangre de cada uno de los donantes sanos y se dispuso en tubos hematológicos tratados con EDTA como elemento anticoagulante. Se preparó una dilución equitativa de sangre en PBS (*Phosphate-buffered Saline*) 1X estéril, que se dispuso cuidadosamente sobre una solución de *Ficoll-Paque Plus*® y seguidamente se centrifugó a 400g durante 30 minutos. Tras la centrifugación, se observó una separación de las células sanguíneas en capas, quedando el plasma en la fase superior, los granulocitos y eritrocitos en el fondo del tubo y los linfocitos, monocitos y plaquetas en la interfase entre *Ficoll* y plasma (**Figura 36**). Con la ayuda de una pipeta Pasteur de plástico, se recogió cuidadosamente la interfase y se efectuaron dos lavados con PBS precedidos de sendas centrifugaciones de 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de eliminar los excedentes de *Ficoll*, plasma y plaquetas. Finalmente, las células mononucleares periféricas fueron contadas y sembradas a una densidad de 200.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos para los sucesivos estudios.



**Figura 36.** Esquema del aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante centrifugación en gradiente de densidad con *Ficoll-Paque Plus*®. Esquema de elaboración propia.

#### 2.3 Cultivo de células MCF-10A

Las células MCF-10A constituyen una línea celular no tumoral de células epiteliales inmortalizadas de mama, derivadas originariamente de tejido fibroquístico humano (190). Desde su descubrimiento en la década de los 90, constituyen un excelente modelo para comprender la biología de las células epiteliales mamarias y comparar su comportamiento respecto a líneas tumorales de mama. Su crecimiento en una mezcla de colágeno y laminina forma estructuras tridimensionales (3D) similares a las estructuras acinares de la mama humana, aunque otros estudios discuten su utilidad como línea tumoral de estudio en experimentos de cultivo en 3D (191).

De acuerdo con las indicaciones comerciales de la ATCC, las células MCF-10A requieren, para su crecimiento, del kit comercial “*Mammary Epithelial Growth Factor Bulletkit*” (Lonza), que incluye el medio de crecimiento basal (*Mammary Epithelial Basal Medium*, MEBM®) y un conjunto de suplementos y factores de crecimiento (extracto pituitario bovino (BPE), hidrocortisona, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) e insulina), “MEGM® SingleQuots®”. Este medio se suplementó además con 1 % de PEST (Biowest) y 100 ng/mL de toxina colérica (SigmaAldrich). La adición de la toxina colérica se justifica por su acción proliferativa sobre células epiteliales, a partir de su efecto activador sobre la adenilato ciclasa (192). Estos estudios obligaron a trabajar con el “Manual de Bioseguridad en los laboratorios para el trabajo con reactivos peligrosos” e indicaciones equivalentes a un nivel 2 de bioseguridad, con la supervisión del Servicio de Prevención de Riesgos laborales de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

Estas células se descongelaron evitando su centrifugación hasta establecer el cultivo, con sustituciones de medio cada dos días, sin superar una confluencia del 70-80 %. Los pases para su mantenimiento se realizaron levantando las células con tripsina, cuyo efecto se detuvo con la adición de una solución neutralizante de tripsina (de soja) al 0,1 %, recomendada por la ATCC (Soybean Trypsin Inhibitor, ATCC® 30-2104™). A partir de la suspensión celular resultante, se estableció una tasa de subcultivo de dilución 1:3.

### 3. Fármacos comerciales usados como controles

El uso de fármacos comerciales permitió comparar los efectos de los compuestos de las quimiotecas de estudio con fármacos control de actividades y mecanismos moleculares conocidos (Tabla 15).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 15. Listado de fármacos comerciales utilizados como controles.**

Fármacos control	Mecanismo molecular	Casa Comercial	Ensayos
4-OH-Tamoxifeno (4-OHT)	Antagonista del ER $\alpha$	Bio-Techne, Tocris Bioscience	LUC, MTT, P-C, WB, PCR, CF, IF
ICI 182780 (ICI)	Antagonista del ER $\alpha$	Bio-Techne, Tocris Bioscience	LUC, MTT, P-C, WB, PCR, CF
Taxol	Agente antitumoral por estabilización de la polimerización de la tubulina	Bio-Techne, Tocris Bioscience	MTT, P-C
Ruxolitinib (RUX)	Inhibidor de JAK1 y JAK2	Selleckchem	LUC
Doxorrubicina (DOXO)	Agente intercalante	Sigma-Aldrich	MTT, P-C
Etopósido (ETO)	Inhibidor de la Topoisomerasa II	Sigma-Aldrich	CF
Cicloheximida (CHX)	Inhibidor de la síntesis de proteínas	Bio-Techne, Tocris Bioscience	CF
Estaurosporina (STP)	Inhibidor pankinasa	Sigma-Aldrich	CF
Dexametasona (DEX)	Agonista del GR	Sigma-Aldrich	LUC
Testosterona (T)	Agonista del AR	Sigma-Aldrich	LUC
Estradiol (E2)	Agonista del ER	Sigma-Aldrich	B
1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT)	Agonista del ER $\alpha$	Bio-Techne, Tocris Bioscience	LUC, MTT, P-C
2,3-bis(4-hydroxyphenyl) propionitrile (DPN)	Agonista del ER $\beta$	Bio-Techne, Tocris Bioscience	LUC, MTT, P-C
Dietilestilbestrol (DES)	Agonista del ER	Sigma-Aldrich	B

Se incluye el nombre del fármaco control, su mecanismo molecular mejor descrito, la compañía que lo comercializa y los ensayos en los que fueron utilizados. Abreviaturas: LUC, Luciferasa; MTT, Viabilidad Celular; P-C, Proliferación-Citotoxicidad; B, Binding; PCR, qRT-PCR; CF, Citometría de Flujo; IF, Inmunofluorescencia; WB, *Western blot*.

## 4. Anticuerpos

En la **tabla 16**, se detallan los anticuerpos (Ab) utilizados a lo largo de esta Tesis Doctoral, junto a su casa comercial, dilución y técnicas en las que fueron utilizados.

**Tabla 16. Listado de anticuerpos (Ab), casas comerciales y técnicas utilizadas.**

Anticuerpos	Casa Comercial	Dilución	Técnicas
1° Ab $\beta$ -Actina (human)	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	WB
1° Ab $\beta$ -Catenina (human)	Sigma Aldrich	1:1000	IF
1° Ab ER $\alpha$ F-10 (mouse)	Santa Cruz Biotechnology	1:500 / 1:200	WB / IF
1° Ab Ki-67 (human)	Miltenyi Biotec	1:50	CF
1° Ab Polyubiquitin (mouse)	EMD Millipore	1:1000	WB
1° Ab STAT5 (rabbit)	Cell signaling Technology	1:1000	WB
2° Ab goat anti-rabbit-IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	1:3000	WB
2° Ab goat anti-mouse-IgG (H+L)-HRP Conjugate	Bio-Rad	1:3000	WB
2° Ab goat anti-mouse AlexaFluor488	Life Technologies	1:1000	IF
2° Ab goat anti-rabbit AlexaFluor647	Life Technologies	1:1000	IF
AnnexinV-FITC	Miltenyi Biotec	1:10	CF

Abreviaturas: CF, Citometría de Flujo; IF, Inmunofluorescencia; WB, *Western blot*.



## 5. Cribado farmacológico de librerías químicas

El cribado farmacológico de librerías químicas es crucial para detectar compuestos con actividad antitumoral (cribado PDD) y/o moduladores químicos que actúen a cualquier nivel de la cascada de señalización dependiente de los ER (cribado TDD). En esta Tesis Doctoral, la selección de potenciales compuestos antitumorales y/o antiestrogénicos se efectuó mediante una estrategia combinada de PDD y TDD, reduciendo el sesgo de considerar al ER como única diana biológica de estudio en cáncer de mama.

Siguiendo las recomendaciones del *National Cancer Institute* (NCI) de EE. UU. (193), el cribado fenotípico se basó en la capacidad de los compuestos de las distintas quimiotecas para inhibir, o no, la viabilidad de los subtipos de células tumorales de mama de interés. Para ello, en primer lugar, se analizaron los efectos de los productos a dosis única (10 micromolar, 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la viabilidad celular, seguido de estudios dosis-efecto (6 niveles de concentración, 0,1-10  $\mu\text{M}$ ) para las moléculas más activas, lo que permitió su clasificación de acuerdo con sus potencias inhibitoras o antagonistas ( $\text{IC}_{50}$ ) y citotóxicas ( $\text{EC}_{50}$ ). Además, el cribado fenotípico permitió conocer la selectividad tumoral de los compuestos estudiados en las diferentes quimiotecas. Algunas de las librerías fueron posteriormente, evaluadas por un sistema de cribado TDD mediante ensayos de luciferasa, lo que permitió orientar la búsqueda de nuevos fármacos en función de dianas biológicas validadas terapéuticamente. Además, para aquellos compuestos de mayor actividad y relevancia farmacológica se realizaron estudios computacionales.

La existencia de compuestos líderes tras el cribado inicial permitió seleccionar y evaluar la potencial actividad citotóxica y antiproliferativa de los compuestos candidatos a través de sistemas de análisis a tiempo real en líneas celulares dependientes de ER, así como en células no tumorales primarias. A continuación, se investigó el mecanismo de acción molecular de las moléculas más eficaces, mediante ensayos mecanísticos detallados que informaron sobre fenómenos biológicos relevantes (estudios transcripcionales en otras dianas, estudios de expresión génica y proteínas, ciclo celular, apoptosis, unión al  $\text{ER}\alpha$ , etc.).

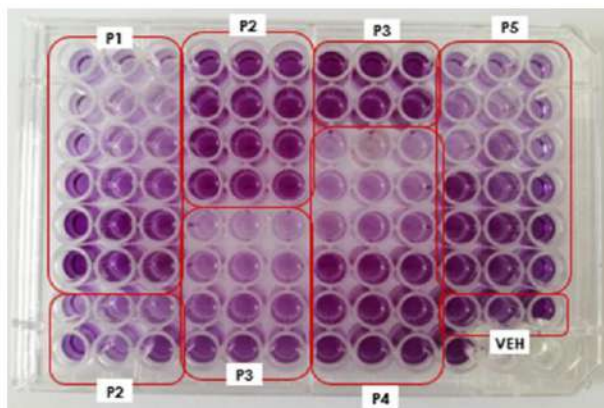
## 6. Ensayos de viabilidad celular

### 6.1. Ensayo de reducción metabólica del MTT

La metabolización mitocondrial del MTT (sal de tetrazolio, (3-(4,5-methyliazol-2yl)-2,5diphenyl-tetrazolium)) (Applichen, Alemania) puede utilizarse como medida indirecta de la viabilidad celular (194). El principio de esta reacción se basa en que, a mayor proporción de células vivas, mayor es la reducción metabólica de la sal de tetrazolio. El proceso genera cristales de color violáceo, que tras ser disueltos con SDS al 10 %, permiten determinar cuantitativamente la densidad óptica resultante. Las diferencias encontradas en el patrón de absorbancia de un

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

fármaco con respecto a su vehículo (VEH) permiten establecer una correlación que mide indirectamente la viabilidad celular. Existe una relación proporcional entre la cantidad de color azul violáceo de los cristales de formazán y el número de células metabólicamente activas (vivas) (Figura 37).



**Figura 37. Fotografía representativa de un experimento de MTT en placas de 96 pocillos.** En la fotografía se muestra el efecto de diferentes dosis de 5 productos (P1-P5) o el VEH. Los pocillos con mayor cantidad de cristales azules de formazán presentan un mayor número de células metabólicamente activas. La ausencia de color o la existencia de un color menos intenso indica la inhibición de la viabilidad celular.

Para estos ensayos, las células se sembraron a su densidad óptima de crecimiento exponencial (2500-20.000 células/pocillo dependiendo de cada línea celular) sobre placas de 96-pocillos (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU. y NUNC, Dinamarca). Tras una fase de estabilización de entre 18 y 24 horas, las células fueron tratadas con vehículo (0,05 % DMSO) o compuesto (generalmente entre dosis de 0,01 - 25  $\mu\text{M}$ ) durante 48-72 horas. Concluido el período de tratamiento, se añadió MTT) a una concentración final de 0,3 mg/mL sobre el medio de cultivo y las células se incubaron a 37°C durante un período entre 2 y 4 horas (variable según la estirpe celular). La metabolización mitocondrial del MTT se usó como indicador de viabilidad celular. Posteriormente, las células se lisaron con SDS al 10 % (Sodium-Dodecyl Sulfate de elevada pureza de Sigma-Aldrich, EE. UU.). Finalmente, se midió la densidad óptica a 595 nm y 655 nm con el lector de placas iMark Microplate Reader™ (Bio-Rad, California, EE. UU.).

La medición de la viabilidad celular mediante ensayos de MTT fue utilizada tanto para el cribado fenotípico (PDD) de las quimiotecas, como para establecer las curvas de crecimiento de todas las estirpes celulares y para los ensayos de *wash-out*.

#### 6.2. Ensayos de wash-out

Los ensayos de *wash-out* constituyen una manera de medir la irreversibilidad del efecto de un fármaco. Permiten determinar el impacto que un producto ejerce sobre una línea celular tras una corta exposición al tratamiento. Estos experimentos siguieron el protocolo base de los ensayos



de viabilidad por MTT con modificaciones relativas a la exposición celular a los compuestos, permitiendo determinar si sus efectos son permanentes o reversibles antes de un determinado tiempo (146). De esta forma, las células se sembraron a 5000–10.000 células por pocillo en placas de 96-pocillos. Tras una fase de estabilización de entre 18 y 24 horas, fueron tratadas con vehículo (0,05 % DMSO) o compuesto (generalmente entre dosis de 0,01–25  $\mu\text{M}$ ) durante 12, 24, 48 y 72 horas. Tras este tiempo, los tratamientos fueron retirados por aspiración y las células se sometieron a tres lavados con 150  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo, dejando períodos de incubación de 20 minutos a 37 °C entre las fases de lavado. Posteriormente, las células se incubaron en medio fresco libre de tratamiento hasta completar 72 horas. A continuación, se añadió MTT a 0,3 mg/mL sobre el medio de cultivo y las células se incubaron a 37°C durante un período entre 2 y 4 horas (variable según la estirpe celular) y se determinó la viabilidad celular, tal y como se describió en el apartado anterior.

## 7. Ensayos de Luciferasa con genes reporteros

Los ensayos de luciferasa con genes reporteros permiten realizar estudios de expresión génica indirecta a partir de la actividad luciferasa producida por la transfección de un gen reportero de luciferasa acoplado al promotor de un gen de interés en una línea celular concreta. Las transfecciones de los constructos con los genes reporteros pueden realizarse de forma transitoria o estable, ofreciendo esta última algunas ventajas como el menor consumo de recursos y, tiempo, así como una menor variabilidad en los datos (195). Además, la transfección estable de líneas celulares ofrece un tipo de ensayos eficaces, específicos y rápidos en comparación con otros ensayos *in vitro* usados en el cribado de fármacos con potencial estro-antiestrogénico, y permite obtener información relevante sobre el mecanismo de acción de un compuesto de interés (40).

Para los ensayos con todas las líneas celulares se siguió el mismo protocolo una vez transcurrido el tiempo y las distintas condiciones de tratamiento. Este consistió en el lavado de las células con PBS frío y adición del tampón de lisis PLB 1X (*Passive Lysis Buffer*, Promega, Wisconsin, EE. UU.), para provocar la lisis celular y la liberación de la luciferasa. Los lisados celulares obtenidos se congelaron a -80°C para, posteriormente, cuantificar la cantidad de proteínas de cada extracto y medir la actividad luciferasa. La actividad enzimática se detectó con el sistema de ensayo de luciferasa (Thermo Scientific, Illinois, EE. UU.) y las lecturas se realizaron en un luminómetro Fluoroskan Ascent FL (Thermo Scientific) tras la adición del reactivo de *Fireflyes* luciferasa (*Luciferase Assay Reagent*, LAR, Promega) o *Renilla* luciferasa (*Renilla Luciferase Assay Kit 2.0*, Biotium, Quimigen S.L.).

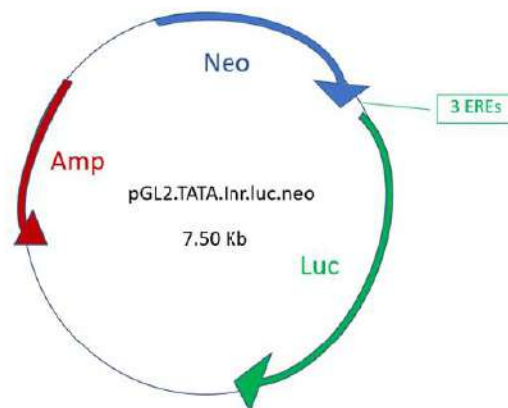
Los resultados de todos los ensayos se presentaron como unidades de luminiscencia relativa (RLU) y fueron normalizados por la concentración de proteínas del extracto (a partir de una recta

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

patrón con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) en NaCl 0.9 %), determinada mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) (196). Los datos obtenidos fueron, además normalizados con respecto a aquellos registrados para la actividad basal de las células control (tratadas con VEH). La actividad se midió y comparó a partir del agonismo puro, a través del máximo efecto ( $E_{max} = 100\%$ ) inducido por el tratamiento estimulatorio; o del antagonismo puro, a través del máximo efecto antagonista detectado en presencia del control de antagonismo de cada ensayo. Una vez determinada la modulación transcripcional del gen de interés en experimentos de dosis fija, se realizaron estudios dosis-efecto. Para ello, se realizaron cálculos de  $EC_{50}$  (dosis a partir de la que se logra la mitad del efecto agonista del estímulo utilizado) y de  $IC_{50}$  (dosis a partir de la cual se logra inhibir el efecto agonista a la mitad). En paralelo, se realizaron experimentos de viabilidad celular con los mismos tratamientos a 24 horas, para demostrar que el efecto modulador de la actividad luciferasa no era consecuencia de algún cambio en la viabilidad celular.

#### 7.1. Ensayos en células T47D-KBluc

La línea celular T47D-KBluc (ATCC® CRL-2865) constituye un clon de células T47D (adenocarcinoma de mama humano ER+) establemente transfectado con el plásmido pGL2.TATA.Inr.Luc.neo (**Figura 38**). Los ensayos de luciferasa en esta línea celular suponen un sistema de análisis a punto final que permite detectar actividades estro- y antiestrogénicas de los compuestos estudiados.



**Figura 38. Representación esquemática adaptada del plásmido reportero de luciferasa resistente a neomicina, pGL2.TATA.inr.luc. neo-11.** El plásmido se construyó a partir de la digestión con fragmentos de restricción. Está constituido por los genes de resistencia a neomicina y ampicilina, el gen reportero de luciferasa y tres elementos de respuesta a estrógenos: pGL2-TATA.Inr. Figura adaptada de (40).

Las células T47D expresan de forma natural los  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  (52). El constructo de transfección incorpora la integración de tres ERE dispuestos en tándem, un promotor de dicha secuencia, un gen reportero de luciferasa (40) y genes de resistencia a neomicina y ampicilina,

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

que permiten seleccionar las células transfectadas. Cuando los ER son activados por E2 o cualquier ligando en células estrógeno-dependientes, estos dimerizan, se translocan al núcleo, reclutan co-activadores/co-represores y se unen a las secuencias ERE del constructo del gen reportero. Esta unión conduce a la activación génica y proteica de la enzima luciferasa, cuya actividad se cuantifica por la cantidad de luz producida en la reacción de la luciferasa con la luciferina, a través de un reactivo específico comercial de luciferasa (LAR, *Luciferase Assay Reagent*, Promega). La cantidad de luz producida es proporcional al nivel de actividad estrogénica. De esta manera, la señal luciferasa detectada, funciona como un marcador del nivel de expresión génica de los ER a nivel transcripcional. Esta técnica permite identificar productos que potencialmente puedan ejercer su actividad a cualquier nivel de la cascada de señalización celular dependiente de los ER (fosforilación, dimerización, translocación nuclear, interacción con el ADN o reclutamiento de activadores). El cribado basado en la diana terapéutica del ER mediante células T47D-KBluc permitió clasificar a los productos en base a las siguientes definiciones:

- **Agonista estrogénico puro**. Producto que, bajo las condiciones de este ensayo, generó una actividad transcripcional luciferasa significativa ( $p < 0.05$ ) comparándola con la actividad generada por el VEH (0,05 % DMSO) y que no produjo una interferencia ni inhibición en la actividad transcripcional luciferasa inducida por el tratamiento con E2.
- **Agonista/Antagonista parcial**. Producto que, bajo las condiciones de este ensayo, generó una actividad transcripcional luciferasa inferior a la generada por el tratamiento con E2 cuando sus efectos eran medidos en presencia de VEH y, sin embargo, era capaz de antagonizar, al menos parcialmente, los efectos del E2 cuando se realizó un tratamiento conjunto con la hormona. En algunos casos de actividad agonista parcial, la combinación sinérgica de un agonista y E2 genera una actividad transcripcional luciferasa mayor que la del E2, produciéndose un fenómeno de superagonismo.
- **Antagonista estrogénico puro**. Producto que, bajo las condiciones de este ensayo, no generó una actividad transcripcional luciferasa significativa ( $p > 0.05$ ) comparándola con la actividad generada por el VEH (0,05 % DMSO), pero que produjo una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad transcripcional luciferasa inducida por el tratamiento con E2.

Por tanto, el ensayo, validado por la agencia americana de protección medioambiental (EPA, Environmental Protection Agency), permite determinar si los productos de una quimioteca son agonistas, antagonistas puros o parciales. El método empleado es rápido, cuantitativo, reproducible y tiene una alta especificidad, dado que las células T47D-KBluc son muy sensibles a estrógenos como el E2 ( $EC_{50} = 0,01$  nM y  $E_{max} = 0,1$  nM), etinilestradiol y dietilestilbestrol (DES), así como a compuestos ambientales de débil estrogénicidad como el 4-nonilfenol, HPTE (pesticida estrogénico) o la genisteína. El antiestrógeno puro ICI 182,780 (ICI) es capaz de inhibir

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

completamente la inducción de la actividad luciferasa dependiente de estrógenos con E2 a 0,1 nM, lo que justifica su empleo como control positivo de la inhibición de la transcripción de estas células (40).

Desde el punto de vista metodológico, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Biowest) suplementado con 10% FBS/L-Glutn/HEPES/NaPyr/Geneticina. Una semana previa al inicio del ensayo, el cultivo celular fue privado de hormonas esteroideas usando 10 % FBS, carbón-dextrano, DCC-FBS (Biowest) mediante cambios de medio y sucesivos lavados cada dos días. Tras ello, las células se sembraron a una densidad de 100.000 células por pocillo sobre placas de 24-pocillos usando el mismo medio RPMI, pero con 5 % de DCC-FBS y aditivos (L-Glutn/HEPES/NaPyr, sin Geneticina ni PEST). Tras 24 horas de estabilización, las células fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO), E2 (0,1 nM), ICI (10 nM) o productos (0,3–10  $\mu$ M) solos (+VEH) o en combinación con E2 durante 24 horas, para seguidamente medir su actividad luciferasa siguiendo el protocolo descrito. Una vez realizado el cribado farmacológico TDD del ER y estudiado el comportamiento de los productos en ensayos dosis-efecto, se obtuvo una aproximación del comportamiento agonista-antagonista de los productos. Con el objetivo de definir el tipo de antagonismo de los productos potencialmente antiestrogénicos, se prepararon ensayos en T47D-KBluc mediante una dosis-respuesta de E2 solo (+VEH) (0,3–1000 pM) o una dosis-respuesta de E2 en presencia de una dosis fija de producto. Estos ensayos permitieron determinar la existencia de antagonismo competitivo o no competitivo en la regulación transcripcional del ER.

#### 7.2. Ensayos en células HEK293

La línea celular HEK293 (14-114ACL: STAT3 Leepporter<sup>TM</sup> Luciferase Reporter-HEK293 Cell Line, Abeomics, San Diego, California, EE. UU.) es un clon de células HEK293 establemente transfectado con un reportero de *Renilla* luciferasa, cuyo control transcripcional depende del promotor de respuesta al factor de transcripción STAT3. Esta línea celular comercial fue utilizada para investigar la existencia de compuestos con capacidad de modular la actividad transcripcional dependiente de STAT3 en respuesta a la estimulación con interleuquina-6 (IL-6). El ensayo es altamente específico, dado que las células HEK293 responden al estímulo de la IL-6 (*Recombinant Human IL-6* de Biosupplies, Pepprotech, EE. UU.), activando con ello la transcripción dependiente de STAT3, con una EC<sub>50</sub> = 10 ng/mL y E<sub>max</sub> = 100 ng/mL, según datos de la hoja técnica comercial. El fármaco ruxolitinib (RUX), un potente inhibidor de JAK1 y JAK2 (197) fue empleado como control de inhibición.

Desde el punto de vista metodológico, las células se sembraron a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos en medio DMEM *High Glucose* (Biowest) (4,5 g/L Glucosa) con 10% FBS inactivado por calor (*heat inactivated*) y suplementado con NaPyr 1 mM,



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

L-Glutn 2 mM, 1 % PEST y Puromicina 3 µg/mL como antibiótico de selección. Tras 24 horas de estabilización, las células fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO), IL-6 (10 ng/mL), RUX (1 µM) y 4-OHT (1–10 µM), ICI (0,3–10 µM) o productos (1–10 µM) solos (+VEH) o en combinación con IL-6 (10 ng/mL). Las muestras estimuladas con IL-6 10 ng/mL requirieron de un proceso de preincubación de los fármacos durante 4 horas antes de proceder a la adición de la IL-6. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 16 horas adicionales, prolongando el tratamiento hasta una duración máxima de 20 horas, para seguidamente determinar su actividad luciferasa siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

#### 7.3. Ensayos en células Ba/F3

La línea celular Ba/F3 (14-135ACL: STAT5 Leepor<sup>TM</sup> Luciferase Reporter-Ba/F3 Cell Line, Abeomics, San Diego, California, EE. UU.) es un clon de células Ba/F3 establemente transfectado con un reportero de *Renilla* luciferasa, cuyo control transcripcional depende del promotor de respuesta al factor de transcripción STAT5. Esta línea celular comercial fue utilizada para determinar la existencia de compuestos con actividad transcripcional dependiente de STAT5 en respuesta a la estimulación con interleuquina-3 (IL-3). El ensayo es altamente específico, dado que las células Ba/F3 responden al estímulo de la IL-3 murina (Mouse IL-3, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y activan con ello STAT5, con una EC<sub>50</sub> = 0.6 ng/mL, según datos de la hoja técnica comercial. El fármaco RUX fue empleado como control de inhibición.

Desde el punto de vista metodológico, las células Ba/F3 se cultivaron en medio RPMI 1640 (Biowest) con 10% FBS inactivado por calor (*heat inactivated*) y suplementado con IL-3 murina a 5 ng/mL, NaPyr 1mM, HEPES 10 mM, PEST 1 % y Puromicina 3 µg/mL como antibiótico de selección. Para los ensayos las células fueron sembradas a una densidad de 600.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, con su medio de cultivo sin incluir IL-3 ni puromicina. Tras 4h de estabilización, las células fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO), IL-3 (30 ng/mL), RUX (1 µM), 4-OHT (1–10 µM), ICI (0,3–10 µM) o productos (1–10 µM) solos (+VEH) o en combinación con IL-3 murina (30 ng/mL). Las muestras estimuladas con IL-3 requirieron de un proceso de preincubación de los fármacos de 4 horas antes de proceder a la adición de la citoquina. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 16 horas adicionales, prolongando el tratamiento hasta una duración máxima de 20 horas, para seguidamente determinar su actividad luciferasa siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

#### 7.4. Ensayos en células MDA-kb2

La línea celular MDA-kb2 constituye un clon derivado de la línea tumoral de mama MDA-MB-453, que fue establemente transfectado con el virus tumoral mamario de ratón (MMTV, mouse mammary tumor virus). Dicho virus, incluye un constructo génico de un neo-reportero de



*Firefly* luciferasa, acoplado a los elementos de respuesta a andrógenos y glucocorticoides (MMTV.luciferase.neo reporter gene). La línea MDA-MB-453 nativa presenta expresión de los receptores nucleares de andrógenos (AR+) y glucocorticoides (GR+), pero no responde a estrógenos ni progesterona, porque carece de ER (ER-) y PR (PR-) (195). La presencia de AR y GR permite que compuestos que modulen sus actividades, activen el reportero de luciferasa MMTV. De este modo, agonistas del AR como la dihidrotestosterona o testosterona (TEST), y agonistas del GR como la dexametasona (DEX), la corticosterona y la aldosterona inducen la activación de sus respectivos receptores. Estos se unen a las secuencias de los elementos de respuesta a andrógenos y glucocorticoides, generando la expresión del gen de la luciferasa acoplado al constructo génico MMTV. De esta manera, la señal luciferasa detectada, funciona como marcador del nivel de expresión génica de AR y GR a nivel transcripcional. El empleo de las células MDA-kb2 permite evaluar la capacidad de los compuestos para actuar como agonistas o antagonistas de los receptores de otras hormonas esteroideas como AR y GR. El ensayo tiene una alta especificidad y sensibilidad, dado que las células MDA-kb2 responden selectivamente a TEST 100 nM y DEX 100 nM, a través de la activación de AR o GR, respectivamente. En caso de estimulación y para diferenciar la actividad de los compuestos sobre uno u otro receptor, es posible ensayarlos en combinación con hidroxiflutamida, vinclozina, metabolitos de la vinclozina M1 y M2, p,p'-DDE y linuron que antagonizan la respuesta dependiente del AR, pero no del GR (195).

Desde el punto de vista metodológico, las células se sembraron a una densidad de 275.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos, en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Biowest) suplementado con 10 % FBS, L-Glutn y PEST. Pasadas 24 horas de estabilización, las células se pretrataron con VEH (0,05 % DMSO), ICI (1  $\mu$ M), 4-OHT (5  $\mu$ M) o productos (0,3–10  $\mu$ M). Tras 6h de tratamiento, se añadió DEX 100 nM, TEST 100 nM o una combinación de los productos de estudio con cada control respectivo, manteniendo el tratamiento durante 24 horas, para seguidamente determinar su actividad luciferasa siguiendo el protocolo descrito. La actividad del AR se comparó con el máximo efecto ( $E_{max} = 100\%$ ) producido por la TEST (agonismo puro). De la misma forma, la actividad del GR se comparó con el máximo efecto ( $E_{max} = 100\%$ ) producido por la DEX.

## 8. Estudios computacionales o *in silico*

Los estudios computacionales de modelado molecular y perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) fueron realizados en colaboración con el grupo QUIBIONAT para aquellos compuestos que mostraron los mejores resultados tras el cribado fenotípico y ensayos de luciferasa.

#### 8.1. Estudios de Modelado Molecular

El modelado molecular asistido computacionalmente se realizó mediante la plataforma "*Schrödinger Small Molecule Drug Discovery v. 2022-2*" (Schrödinger, NY, EE. UU.), que actuó de guía para el descubrimiento de moléculas únicas con interés terapéutico. Brevemente, se utilizó la información provista por las coordenadas de rayos X de bancos de datos de proteínas para preparar y refinar ciertas estructuras privilegiadas (LBD del ER) mediante *docking* molecular. Posteriormente, las moléculas fueron preparadas en una conformación con mínima energía y los ligandos fueron acoplados a los sitios activos de los ER utilizando el algoritmo de precisión Glide "*Xtra precision*" (Schrödinger, NY, EE. UU.) en un estudio de *docking* molecular. Este proceso se llevó a cabo usando las estructuras cristalinas del ER $\alpha$  en su LBD en conformación agonista con la genisteína (PDB 1X7R), en conformación antagonista con el 4-OHT (PDB 3ERT) y en conformación antagonista con el raloxifeno (PDB 1ERR). A cada compuesto de la quimioteca se le asignó una puntuación, "*Glide score*", lo que permitió su clasificación en función de sus interacciones electrostáticas y alostéricas en el sitio de unión de la molécula diana. El sitio de unión a la molécula diana se definió generando una red tridimensional que circundaba su sitio activo. A efectos prácticos, se intenta predecir la afinidad de unión del compuesto a la diana terapéutica estudiada.

#### 8.2. Estudios ADME

El cribado *in silico* mediante estudios ADME fue realizado para aquellos compuestos de mayor interés farmacológico, empleando nuevamente el software de Schrödinger (programa QikProp versión 6.3 (Schrödinger, NY, EE. UU., 2020). El ADME aporta una visión predictiva de cómo podrían comportarse los productos *in vivo* (toxicidad sobre el Sistema Nervioso Central, CNS; metabolismo hepático, #metab; o grado de absorción oral, % HAO), lo que permite estimar dosis, duración, vía de formulación o vía de administración, entre otras variables. El perfil predictivo permite asimismo estimar la biodisponibilidad y la capacidad farmacéutica potencial de los compuestos en función de las reglas de Lipinski, donde se produce una alta probabilidad de desarrollar exitosamente un fármaco si se cumplen dos o más características farmacocinéticas (198,199). A partir de estos perfiles ADME se realizó una predicción sobre algunas de sus propiedades farmacocinéticas más relevantes (**Tabla 17**).

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 17. Variables y parámetros empleados para establecer el perfil ADME de los compuestos de interés.**

Propiedades	Definición	Rango de valores
#stars	Similitud con otros fármacos (número de propiedades que caen fuera del rango del 95% de los valores de los fármacos conocidos)	0-5
CNS	Predicción de la actividad en el sistema nervioso central	-2 (inactivo) a +2 (activo)
QPlogBB	Predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre	-3.0 a +1.2
QPPCaCo2	Predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en nm/s	<25 deficiente >500 eficiente
QPPMDCK	Predicción de la permeabilidad en la línea celular de riñón canina Madin-Darby (MD) en nm/s.	<25 deficiente >500 eficiente
QPlogKhsa	Predicción de la unión a la albúmina humana sérica	-1.5 a +1.5
QPlogPo/w	Predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua	-2.0 a +6.5
QPlogKp	Predicción de la permeabilidad en la piel	-8.0 a +1.0
QPlogS	Predicción de la solubilidad acuosa	-6.5 a +0.5
#metab	Número de reacciones metabólicas probables	1 a 8
% HOA	Predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%	>80 % alta <25 % baja
HOA	Predicción cualitativa de la absorción oral humana	1 (bajo), 2 (medio) o 3 (alto)
PSA	Área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de átomos carbonilos	7 a 200
SASA	Superficie total accesible al disolvente	300 a 1000
MW	Peso Molecular	130 a 725
#rotor	Número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos	0 a 15
donorHB	Número de donantes de enlaces de hidrógeno	0 a 6
acptHB	Número de aceptores de enlaces de hidrógeno	2 a 20

Se incluyen el nombre de las propiedades del perfil ADME, el rango en el que se mueven sus valores y la definición de la característica estudiada. Tabla tomada y adaptada de la Tesis Doctoral de Aranda-Tavío, 2022 (140).

## 9. Ensayos de proliferación

La medida del crecimiento es un rasgo crucial de la fisiología celular normal y también de la fisiología aberrante de los tumores. Puede medirse en términos de proliferación o de reducción del tejido estudiado, a partir de la superficie ocupada por las células. El espacio ocupado por una densidad celular determinada se conoce como confluencia y sus valores se expresan en porcentaje. Existen diversos sistemas de análisis a tiempo real que permiten monitorizar el crecimiento o proliferación tumoral en presencia de medio de cultivo o de los fármacos de ensayo. Aunque los ensayos de proliferación son bastante útiles para establecer cinéticas de crecimiento, regresión o mantenimiento tumoral, son inespecíficos, ya que el crecimiento tumoral está regulado por múltiples factores.

### 9.1. Ensayos de proliferación en xCelligence

El sistema xCelligence (Roche Holding, Basel, Suiza) comprende un sistema de análisis celular a tiempo real, no invasivo, que permite monitorizar la cinética de proliferación de poblaciones celulares en función de la impedancia eléctrica de cada superficie de estudio. Las

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

células emiten señales eléctricas al crecer sobre los pocillos cubiertos con microelectrodos de oro en función de su crecimiento, morfología y fuerza de unión. Las señales eléctricas se registran bajo la unidad de medición de un índice celular (CIX, *Cell Index*), que refleja cambios en el tamaño y el número de células adherentes sobre la superficie sembrada.

En los experimentos realizados con esta técnica, se utilizó el modelo celular T47D. Así, las células se cultivaron en medio RPMI sin rojo fenol y se privaron de estrógenos con 10 % DCC-FBS, de manera que el crecimiento o la paralización de este, pudiera asociarse con la adición de estrógenos y de agonistas que mimetizaran su comportamiento; o de antagonistas que evitaran el progreso tumoral, respectivamente. El VEH determinó el nivel de impedancia basal de las células en cultivo. Para cada experimento, las células se sembraron a 2000 células/pocillo sobre placas de cultivo de tipo *E-Plates* (Roche). La medida se realizó a tiempo final, tras 96 horas de experimento y el crecimiento se expresó mediante la impedancia eléctrica a través de cambios en su CIX y registrando los valores crudos en el software de análisis del sistema.

#### **9.2. Ensayos de proliferación en Incucyte™ HD ZOOM e Incucyte™ SX5**

El trabajo con células vivas requiere de un proceso de monitorización y cuantificación de sus cinéticas de crecimiento, morfología, proliferación celular y citotoxicidad, entre otros. Para lograr este objetivo, se utilizó el sistema de adquisición de imágenes por fotomicroscopía a tiempo real, IncuCyte™ HD ZOOM para estudios 2D, y el sistema IncuCyte™ SX5 (ambos de Essen BioScience, Hertfordshire, Reino Unido) para estudios 3D. Estos equipos permiten programar esquemas de placas, tiempos de estudio y frecuencia de capturas durante un período de días e incluso semanas. Además, el programa informático que da soporte a este sistema permite la aplicación de un algoritmo que genera una máscara gráfica. Dicha máscara reconoce, en contraste de fases, el espacio ocupado por las células en monocapa y calcula el porcentaje de ocupación respecto a la totalidad del espacio del pocillo (imagen individual). Esto permite definir, para cada pocillo y condición de tratamiento, la variable confluencia. El resultado del análisis gráfico de imagen es una cinética con cambios de confluencia respecto al tiempo, que permite evaluar si las células están en estado de crecimiento, de latencia o en reducción de su masa celular. Al mismo tiempo, el propio software informático, posibilita también la creación de modos de imagen con máscaras de color verde y rojo, que detectan la fluorescencia de emisión de fluorocromos. En estos estudios, el uso de YOYO-1 (Essen Bioscience, Sartorius, Göttingen, Alemania), una sonda fluorescente verde que marca el ADN nuclear de células dañadas o muertas, permitió la detección de células no viables y la cuantificación del porcentaje de confluencia verde respecto al porcentaje total de confluencia del pocillo. Con ello se definió una nueva variable conocida como citotoxicidad para la que es posible estudiar también su cinética.



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos se diseñaron a partir de 3-6 replicados en pocillos por cada condición de tratamiento, lo que garantiza una medida estadísticamente significativa para cálculos de % de confluencia o % de citotoxicidad. Los datos analizados se representaron mediante gráficas, que se generaron a partir del cálculo del área bajo la curva (AUC, *Area Under Curve*). Tanto para estudios 2D como 3D, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, y se trataron con VEH o productos (0,01  $\mu\text{M}$  – 25  $\mu\text{M}$ ) resuspendidos en medio con YOYO-1 (25 nM), tras 18-24 horas de estabilización, tiempo a partir del cual se monitorizó su crecimiento.

El sistema IncuCyte™ SX5, empleado para los estudios 3D, dispone de un módulo específico de cultivo de esferoides. Los cultivos 3D reproducen con mayor fidelidad las condiciones fisiológicas que los cultivos tradicionales (2D), aproximando el ensayo a la biología tumoral real. Por esta razón, suponen una ventaja a la hora de seleccionar compuestos con una mejor aplicación a la clínica (200,201). Para estos experimentos, fue necesario el uso de placas de ultra baja adhesión celular (Ultra Low Attachment Plates, ULA, Corning, NY, EE. UU.) y la siembra de un número de células (1.000–2.000 células/pocillo) inferior al utilizado en experimentos 2D, que deben, además, ser centrifugadas a 200g durante 10 minutos con aceleración y desaceleración mínimas a temperatura ambiente. Esto favorece la formación de esferoides. Tras la centrifugación, las placas deben equilibrarse en el IncuCyte™ SX5 durante 20 minutos antes de programar la primera lectura y sucesivas capturas de imágenes (*scanning* de repetición cada 6 horas durante 5-10 días), permaneciendo en fase de estabilización entre 24 y 72 horas para permitir un adecuado tamaño (entre 200-400  $\mu\text{M}$ ) y forma compacta del esferoide. Una vez formados los esferoides, se procedió a su tratamiento con VEH o productos (0,01  $\mu\text{M}$  – 25  $\mu\text{M}$ ) resuspendidos en medio con YOYO-1 (25 nM), fijando ese punto temporal como el tiempo cero del experimento. En aquellos ensayos de duración superior a 5 días, se retiraron 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo y se añadió medio nuevo (proceso de realimentación de los esferoides), recogiendo las lecturas hasta el fin del experimento. El crecimiento del tamaño esferoidal y la citotoxicidad se monitorizaron tomando capturas cada 6 horas durante 5-10 días en contraste de fases (*Brightfield*, BF) y fluorescencia verde. El cálculo del crecimiento de los esferoides se realizó a partir de un algoritmo del software que detecta el área registrada en el campo de visión como *Largest Brightfield Object Area* ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### 9.2.1. Ensayos de proliferación en medio desprovisto de estrógenos

El estudio de los efectos estrogénicos o antiestrogénicos de los productos de estudio puede evaluarse mediante ensayos de proliferación. Este método está basado en el test E-SCREEN agonista/antagonista, pero en lugar de evaluar la capacidad de modular la proliferación inducida por E2 en células MCF-7/BUS (202,203), el estudio se plantea en células T47D desprovistas de estrógenos. El ensayo permite comparar cuantitativamente la proliferación de las células



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

expuestas a los productos solos (+VEH) y en presencia de E2 a 0,1 nM para detectar agonismo y antagonismo, respectivamente.

Desde el punto de vista metodológico, las células fueron privadas de estrógenos durante 7-10 días. Esto se logró añadiendo medio de cultivo 5-10% DCC-FBS y los correspondientes aditivos (según la línea celular) en sucesivos pasos de lavado durante el tiempo establecido. Tras los lavados, las células se sembraron a su densidad óptima de crecimiento exponencial y al día siguiente fueron tratadas con productos (0,03-10  $\mu$ M), ICI (0,03–10 nM) o 4-OHT (0,01–10 nM) en ausencia (+VEH) o presencia de E2 (0,1 nM), en medio de cultivo 5-10% DCC-FBS. Los productos PPT y DPN (0,01–3 nM) se emplearon como controles positivos adicionales de agonismo de los ER. La citotoxicidad se midió mediante el uso de YOYO-1 (25 nM), que se añadió en paralelo al tratamiento. El crecimiento en términos de proliferación y citotoxicidad dependientes de estrógenos se monitorizó con el IncuCyte™ ZOOM, tomando capturas cada 6 horas durante 5-10 días. El cálculo del AUC permitió analizar las cinéticas de crecimiento y el comportamiento celular frente al estudio dosis-efecto.

Posteriormente, en un diseño experimental similar en cuanto a la preparación y cultivo de células, pero diferente en la ejecución del tratamiento, el modelo celular se expuso a concentraciones submaximales de E2 en una dosis-respuesta ( $10^{-14}$  M –  $10^{-9}$  M), o bien a una dosis-respuesta de E2 en presencia de una dosis fija de cada uno de los productos de interés. Este diseño permitió categorizar los productos como antagonistas competitivos o no competitivos de los ER.

## 10. Ensayos de afinidad-*binding*

Los ensayos de afinidad, unión o competición entre ligandos, – *binding* –, permiten estudiar la eficacia con la que una molécula compite con el ligando endógeno por un receptor específico. Respecto a los ER, los ensayos de afinidad miden la habilidad de un compuesto para competir con el E2 u otro ligando por la unión con dichos receptores. Existen diferentes ensayos de afinidad para dilucidar posibles interacciones con el ER $\alpha$ , entre los que destacan los ensayos basados en radioligandos (por ejemplo, E2 tritiado) o ensayos con kits comerciales de laboratorio.

En estos estudios, los compuestos de interés procedentes de las quimiotecas fueron testados mediante el kit LanthaScreen® TR-FRET RE $\alpha$  (A15887, Thermo Fisher Scientific, EEUU), que hace uso del LBD del ER $\alpha$  recombinante humano. La TR-FRET RE $\alpha$  es una técnica que emplea la espectroscopía basada en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, *Fluorescence resonance energy transfer*) resuelta en el tiempo (TR, *Time-Resolved*), que permite detectar ligandos para el ER $\alpha$  humano al detectar interacciones moleculares entre ellos. La técnica se basa en la transferencia de energía de un fluoróforo que actúa como donante (quelato de un lantánido como lantano, terbio o europio) a un fluoróforo que actúa como aceptor. Esta cesión de

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

energía solo se produce cuando existe interacción entre moléculas al encontrarse a una distancia suficientemente corta (1-10 nm de longitud). En el proceso se calcula la variación de fluorescencia cuando la muestra es irradiada con luz, de manera que la excitación del primer fluoróforo resulta en la transferencia de energía al aceptor, que produce un incremento de la fluorescencia al emitir radiación (204,205). En esta técnica de TR-FRET adaptada al ER $\alpha$ , el kit LanthaScreen emplea el dominio LBD del ER $\alpha$  marcado con glutatión S-transferasa (GST), un Ab anti-GST marcado con terbio y un ligando fluorescente del ER de pequeño tamaño, llamado Fluormone<sup>TM</sup> ES2, que actúa como control positivo de unión al LBD en el ensayo. Cuando el ligando fluorescente se asocia al ER $\alpha$ , se produce la ocupación del dominio LBD y la transferencia de energía desde la GST con el Ab marcado con terbio hasta el ligando fluorescente, emitiéndose energía que es detectada con una fluorescencia de 520 y 495 nm. La unión de un ligando al ER $\alpha$  produce el desplazamiento de Fluormone, que se salda con la pérdida o reducción de la energía TR-FRET cuantificada. Esto permite evaluar la afinidad relativa de los compuestos por el ER $\alpha$ . En estos ensayos se utilizaron E2, DES o 4-OHT (1 E-4 – 20  $\mu$ M) como controles.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de competición con el ER $\alpha$  a partir de extractos citosólicos uterinos de rata (RUC). Los ensayos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (OEBA-ULPGC 40/2020) y los experimentos se desarrollaron de acuerdo con las guías de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica, OECD (ER-RVC OPPTS 890.1250). Brevemente, ratas Sprague-Dawley hembra de 8-12 semanas de edad se ovariectomizaron con anestesia con ketamina/metomidina (75 mg y 1 mg por cada kg de animal, respectivamente) y se sacrificaron tras 13-16 días por dislocación cervical y anestesia con pentobarbital (50  $\mu$ g/kg). La ovariectomía de las ratas permitió el aislamiento y limpieza de sus úteros, que se congelaron en nitrógeno líquido. Los úteros fueron posteriormente agrupados y homogeneizados en tampón TEGM (10 mM Tris, 1.5 mM EDTA, 10% glicerol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7.4) con un homogeneizador mecánico Polytron PT3000 (Kinematica, Lucerna, Suiza) durante 1 min a 15.000 rpm, con un ratio de 50 mg de tejido por ml de tampón. El homogeneizado se filtró con una malla de nylon de 60-100  $\mu$ m y se centrifugó a 105.000 g durante 50 minutos a 4°C para obtener los RUC. La concentración de proteínas se determinó con el método de Bradford (196), ajustando la cantidad de proteínas a 2 mg/mL. En el momento del ensayo, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l RUC y se incubaron con E2 tritiado a 3 nM, [3H]E2 (NEN Estradiol [2,4,6,7-3H(N)]; SA: 70-115 Ci/mmol; >97% pureza; PerkinElmer, España) o concentraciones crecientes de los competidores potenciales no marcados (0,1 nM-100  $\mu$ M) durante 18 horas a 4°C. Seguidamente, se añadieron a las muestras 200  $\mu$ l de suspensión DCC (0,8 % carbón vegetal; 0,08 % dextrano; p:p) en tampón TEGM y se incubaron durante 10 minutos. A continuación, se eliminó el DCC mediante centrifugación a 3000 g durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante para medir la radiactividad en 4 ml de cóctel de centelleo Optiphase Hisafe 2 (PerkinElmer, España) utilizando el contador LKB Wallac 1214-

Rackbeta (LKB Instruments, Victoria, Australia). Finalmente, se efectuaron correcciones para la unión no específica.

## 11. Ensayos para el estudio de la actividad enzimática fosfatasa alcalina

La expresión de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) está bajo riguroso y estricto control estrogénico a nivel transcripcional. Por esta razón, su estudio permite investigar la actividad agonista y antagonista de determinados productos sobre un modelo celular concreto. Los ensayos de la actividad enzimática ALP se basan en un método colorimétrico que consiste en la hidrólisis de p-nitrofenil fosfato (pNPP) a p-nitrofenol (a pH 10.4) y la determinación espectrométrica en la cinética de formación de este a 405 nm en un lector de placas. La hipótesis de partida se basa en que las células de cáncer de endometrio uterino, células Ishikawa, (206,207) producen ALP en respuesta a E2 (208). La interferencia en la expresión de la enzima, al evaluar el efecto de los productos, permite determinar la existencia de antagonismo uterino, uno de los requisitos máspreciados en el desarrollo preclínico de nuevos terapéuticos en cáncer de mama.

De forma resumida, en estos experimentos las células Ishikawa se cultivaron en medio MEM sin rojo fenol con sales de Earl y 10 % DCC-FBS (206,209) durante 5 días. Posteriormente, fueron tripsinizadas y sembradas a 100.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos en medio MEM 5 % DCC-FBS. El día posterior a la siembra, se refrescó el medio de cultivo y se trataron las células con VEH (0,05% DMSO), 4-OHT (0,3–3  $\mu$ M), ICI (0,1  $\mu$ M) o productos (0,3–10  $\mu$ M), solos (+VEH) o en combinación con E2 (10 nM) durante 24, 48 y 72 horas. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X frío y se levantaron de la superficie del plástico con la ayuda de *scrappers* de silicona. La suspensión celular procedente de cada condición de tratamiento se recogió en tubos Falcon (Corning, NY, EE. UU.) de 15 ml, que fueron centrifugados a 650 g durante 10 minutos a 4 °C. A continuación, se retiró el sobrenadante de las muestras y las células fueron lisadas con *ALP buffer*, incluido en el kit comercial "*Alkaline Phosphatase Assay Kit*" (Abcam, Cambridge, Reino Unido), al que se le añadió un 0,1 % de detergente NP-40. Tras resuspender las muestras evitando la formación de espuma, estas fueron incubadas en agitación durante 30 minutos a 4 °C, centrifugadas a 14.000g durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron almacenados para su posterior análisis. Entonces, las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos, donde se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP, incluido en el kit) y la enzima ALP catalizó su conversión en p-nitrofenol, de coloración amarilla. La actividad enzimática se cuantificó tras 1h de incubación de las muestras a 25 °C, a través del análisis de la densidad óptica a 405 nm en el lector de placas *iMark Microplate Reader*<sup>TM</sup>, comparando los valores obtenidos respecto a una curva patrón de pNPP preparada en paralelo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de actividad enzimática obtenidos fueron normalizados respecto a la cantidad de proteínas, que se determinó mediante el método del ácido bicinónico

(BCA) (Bio–Rad, CA, EE. UU.) para cada muestra. La fórmula matemática que permite el cálculo de la actividad ALP fue la siguiente: Actividad ALP =  $[B / (\Delta T * V)] * D$ .

En esta expresión matemática, B se refiere a la cantidad de pNPP en la muestra, calculada correctamente de la curva estándar (valor extrapolado de la curva en  $\mu$ moles);  $\Delta T$  es el tiempo de reacción en minutos (normalmente equivale a 60 minutos); V es el volumen de muestra original añadido al pocillo de reacción (se expresa en mL); D representa el factor de dilución de la muestra. La máxima actividad enzimática ALP se obtuvo del valor obtenido para el tratamiento con E2 (10 nM) y se expresó como el valor de máxima eficacia ( $E_{max} = 100 \%$ ) para este ensayo, lo que permitió la determinación de los valores de IC50 y EC50.

## 12. Ensayos para análisis de expresión de ARNm por PCR cuantitativa a tiempo real

La metodología relativa a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés, "*Polimerase Chain Reaction*", cuantitativa (q) a tiempo real (RT) (q-RT-PCR) se utilizó para identificar efectos de los productos de interés sobre la expresión de ARN mensajero (ARNm) de genes diana del ER. En estos experimentos las células se sembraron en medio al 10 % DCC-FBS a densidades de 1.250.000 (MCF-7) y 1.500.000 (Ishikawa) de células por placa de 100 mm. Luego, las células fueron deprivadas de hormonas esteroideas tras 5 días de lavado con medio de cultivo 10 % DCC-FBS, y seguidamente, se pasaron a medio con 5 % DCC-FBS, para la adición de tratamiento con VEH (0,05 % DMSO), 4-OHT (1–5  $\mu$ M), ICI (0,1  $\mu$ M) o productos (3–10  $\mu$ M), solos (+VEH) o en combinación con E2 (10 nM) durante 24–48 horas. Finalmente, las células se lavaron con PBS 1X, se levantaron con *scrappers* y se centrifugaron a 650 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, el ARN se extrajo mediante el método de separación con isopropanol-cloroformo y el reactivo de extracción TRIidty G<sup>TM</sup> (PanReac Applichem, ITW Reagents, Darmstadt, Alemania). La concentración y calidad del ARN total se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop-1000 (ND-1000, Wilmington, EE. UU.). A partir de 1  $\mu$ g de ARN se sintetizó el ADN complementario (ADNc) mediante el empleo del kit *iScript Reverse Transcription Kit* (Bio–Rad), de acuerdo con las instrucciones del fabricante y un programa de 10 minutos a 25 °C, 2 horas a 37 °C y 5 minutos a 85 °C. Una vez obtenido el ADNc, se procedió a su amplificación mediante q-RT-PCR, haciendo uso de la mezcla *SYBR-Green PCR Master Mix<sup>TM</sup>* (Applied Biosystems, Massachussets, EE.UU.) y *primers* específicos (STAB VIDA, Caparica, Portugal) (**Tabla 18**), en el termociclador *Mx3005p qPCR System* (Agilent Technologies, CA, EE. UU.).



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

**Tabla 18. Genes empleados para los estudios de expresión génica por q-RT-PCR.**

Gen de estudio	Fw	Rv	Diseño
<i>18S</i>	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	TTGGCAAATGCTTTCGCTC	[1]
<i>ERα</i>	TCTATTCGAGTATGATCCTACCA	CAGACGAGACCAATCATCAG	[2]
<i>PR</i>	GGCGAGAGGCAACTTCTTC	CATCTGCCCACTGACGTGTT	[2]
<i>NCOA-1</i>	CCTCATGGGTTGCCTCTTCAT	ACTCGTTAATTTGGGCTTTGGC	[3]
<i>pS2</i>	GTCCCCTGGTGCTTCTATCC	CTAATCACCGTGCTGGGGAC	[3]

Se detallan el nombre del gen, los cebadores utilizados en la reacción (tanto *Forward*, Fw como *Reverse*, Rv) en sentido 5'-3' y el origen de su diseño tomado de [1] (210); [2], (211); [3], *primer* BLAST (NCBI-NIH) (212).

La expresión génica se analizó a partir del resultado de los valores de expresión en umbrales de ciclo (*cycle threshold*, Ct), y los valores se normalizaron con respecto al gen de referencia (*housekeeping gene*) *18S*. Los datos se presentaron como la media de los valores de expresión relativa según el método comparativo de Ct para qPCR (213).

### 13. Ensayos de inmunodetección de proteínas por *Western-blot*

El análisis de expresión de proteínas se realizó a partir de ensayos de inmunodetección por *Western blot* (WB). En estos experimentos, las células (T47D) se sembraron a densidades de 1.000.000 de células por cada placa de 100 mm, permitiendo su estabilización *overnight*. A la mañana siguiente, se trataron con VEH (0,05 % DMSO), productos, ICI o 4-OHT a las dosis y tiempos (24–72 horas) definidos para cada experimento concreto. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS-ortovanadato (1 mM)-NaF (20 mM) y se levantaron con *scrappers*. A continuación, se procedió a su centrifugación a 500g y a la resuspensión del pellet celular en el tampón de lisis RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) al que se le añadió un *cocktail* de inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Para favorecer el proceso de lisis celular, las muestras celulares se dejaron en agitación durante 30 minutos en una noria a 4°C. A continuación, los lisados se centrifugaron, y se recogió el sobrenadante conteniendo las proteínas, que fueron cuantificadas utilizando el método del BCA (Bio-Rad, CA, EE. UU.). El proceso continuó con la preparación de cantidades homogéneas de proteínas (80 µg) en *buffer* RIPA, que fueron desnaturalizadas a 95 °C durante 5 minutos y cargadas en geles de electroforesis de SDS-PAGE al 10 %. Posteriormente, las proteínas separadas en función de su peso molecular fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (iBlot® Gel Transfer Stacks; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), que fueron sometidas a un proceso de bloqueo de uniones inespecíficas con 5 % de *blotto* (solución de leche desnatada en polvo, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para los Ab específicos de proteínas totales, o bien con 5 % de BSA (Merck, Darmstadt, Alemania) o 1 % BSA–1 % *blotto*, para los Ab de proteínas fosforiladas. En todos los casos, *blotto* y BSA se diluyeron en *Tris-buffered saline* (TBS) con 0,05 % del detergente Tween 20 (TBS-T)



y el bloqueo se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras ello, las membranas se incubaron *overnight* a 4 °C con los Ab primarios correspondientes (**Tabla 16**). El Ab *anti-β-actina* (Santa Cruz Biotech, CA, EE.UU.) se utilizó como control de carga. A la mañana siguiente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas durante una hora en agitación a temperatura ambiente con los respectivos Ab secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés "*horseradish peroxidase*"). Varios lavados posteriores permitieron la eliminación del exceso de Ab secundario.

Las bandas de las proteínas se detectaron y visualizaron por medio del revelado en una reacción quimioluminiscente, que se produjo por la adición del sustrato *Clarity™ Western ECL Substrate* (Bio-Rad, EE.UU.) en un transiluminador de tipo Chemidoc XRS (Bio-Rad). Las imágenes de la expresión de proteínas obtenidas en estos ensayos se analizaron y cuantificaron mediante el software *Quantity One* (Bio-Rad).

## **14. Ensayos para la evaluación del ciclo celular y de fenómenos de apoptosis**

### **14.1. Ciclo Celular**

Para los estudios del ciclo celular se emplearon células T47D no sincronizadas, que fueron sembradas a una densidad de 250.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Un día posterior a la siembra, las células se trataron con VEH (0,05% DMSO), productos (5 μM y 10 μM) o 4-OHT (5 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Tras este período de incubación, las células se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron, contaron y fijaron con etanol frío al 70 % *overnight* a -20° C. El pellet celular se resuspendió en un tampón de ensayo casero (2 mM EDTA, 2% FBS en PBS 1X), efectuando dos lavados con tampón de ensayo con sendas centrifugaciones de 10 minutos y 500 g a 4° C. Posteriormente, se resuspendió nuevamente el pellet celular en tampón de ensayo y se añadieron los Ab Ki-67-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a 1:50 y el marcador celular 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich), a 1:100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron para retirar el exceso de marcaje, se centrifugaron a 5000g y se añadieron 500 μl de tampón de ensayo para adquirir las muestras en el citómetro de flujo MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), fijando un máximo de 20.000 eventos.

### **14.2. Apoptosis**

La apoptosis se estudió mediante ensayos de Anexina V por citometría de flujo con el equipo MACSQuant 10. Para ello, se emplearon células T47D no sincronizadas que se sembraron a una densidad de 200.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Un día tras la siembra, las

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

células se trataron con VEH (0,05% DMSO), productos (5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), 4-OHT (5  $\mu$ M), etopósido (ETO, 10  $\mu$ M), cicloheximida (CHX, 40  $\mu$ M) o estaurosporina (STP, 1  $\mu$ M) usados como controles positivos de apoptosis, durante 48 y 72 horas. Brevemente, las células se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron, se contaron y se centrifugaron a 300g durante 10 minutos. Llegados a este punto, se siguió el protocolo del kit de apoptosis Annexin V-FITC (Miltenyi Biotec), resuspendiendo el pellet celular en 100  $\mu$ l de tampón frío "*AnnexinV binding buffer*" (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Se añadieron 10  $\mu$ l del Ab Annexin V-FITC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron lavadas con 1 mL de "*AnnexinV binding buffer*" para retirar el exceso de Ab y se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Por último, las células se resuspendieron en 500  $\mu$ l de "*AnnexinV binding buffer*" y yoduro de propidio (PI) (100  $\mu$ g/ml) en una dilución 1:100. Las muestras fueron inmediatamente adquiridas en el citómetro de flujo MACSQuant 10 fijando un máximo de 20.000 eventos.

## 15. Ensayos de inmunofluorescencia por Microscopía Confocal

Los ensayos de inmunofluorescencia permiten estudiar la expresión y localización subcelular de proteínas en células fijadas y permeabilizadas, haciendo uso de Ab específicos. En el contexto de esta Tesis, estos ensayos resultaron muy útiles para evaluar la eficacia de los compuestos de interés para inhibir la translocación nuclear de los ER activados por E2. Complementan adecuadamente los experimentos de WB identificando el compartimento subcelular en el que aparece un cambio de expresión y/o translocación del ER $\alpha$ .

A nivel metodológico, las células T47D fueron deprivadas de estrógenos durante una semana, haciendo uso de medio de cultivo RPMI sin rojo fenol al 10 % de DCC-FBS. Seguidamente, las células se tripsinizaron y se sembraron a 175.000 células por pocillo en medio de cultivo al 5 % DCC-FBS en placas de 6 pocillos que contenían, en cada uno de ellos, un cubreobjetos de 22x22 mm (Menzelgläser, vWR, Pensilvania, EE. UU.). Las células se mantuvieron *overnight* y al día siguiente, fueron tratadas con VEH (0,05% DMSO), productos (5  $\mu$ M) o 4-OHT (5  $\mu$ M) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con E2 (1 nM) durante 30 minutos. Transcurrido ese período de exposición, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich, EE. UU.) durante 15 minutos, se bloquearon y permeabilizaron simultáneamente con PBS al 0,5 % de BSA y 0,1 % de Triton™ X-100 (Thermo Scientific, Illinois, EE. UU.) en tres lavados sucesivos de 15 minutos (214). Terminada esta fase, las células se incubaron con los Ab primarios ER $\alpha$ -F10 murino (Santa Cruz Biotech, CA, EE. UU.) y  $\beta$ -catenina de conejo (Sigma-Aldrich, EE. UU.) en la misma solución de bloqueo de PBS-0,5 % BSA-0,1 % Triton. La incubación se realizó *overnight* a 4°C en el interior de una cámara

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

húmeda. A la mañana siguiente, se realizaron tres nuevos lavados con PBS-0,5 % BSA-0,1 % Triton y se procedió a la incubación de las células con una solución de Ab secundarios que contenían el Ab *anti-mouse* Alexa fluor 488, el Ab *anti-rabbit* Alexa fluor 647 (Life Technologies, CA, EE. UU.) y el marcador celular DAPI (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se prepararon mediante el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio con medio de montaje Fluormont-G® (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) (214). Finalmente, se procedió a la captura de imágenes, su estudio y análisis en un Microscopio Confocal Zeiss LSM 800+ (Carl Zeiss AG, Jena, Alemania), perteneciente al Servicio de Investigación en Microscopía Avanzada Confocal y Electrónica (SIMACE) adscrito al IUIBS de la ULPGC. La señal fluorescente obtenida se cuantificó usando un método de segmentación de análisis de imágenes (215).

#### **16. Ensayos de combinación de fármacos**

Para investigar el posible efecto sinérgico entre los compuestos seleccionados (PLR-56 y PLR-67) y el fármaco de primera línea en el tratamiento del cáncer de mama ER+, el 4-OHT, se realizaron combinaciones de PLR-56 o PLR-67 con 4-OHT y se evaluó la viabilidad de células MCF-7 mediante ensayos de MTT tras 72 horas de tratamiento. Estas combinaciones también fueron testadas tras 72 horas de tratamiento en células MCF-10A de mama sanas para evaluar la existencia de signos de citotoxicidad.

Brevemente, las células MCF-7 o MCF-10A se sembraron a 5000 o 7500 células por pocillo en placas de 96 pocillos, respectivamente. Para identificar el posible comportamiento sinérgico de las combinaciones de fármacos testadas, las células se expusieron a los compuestos PLRx y al 4-OHT, tanto individualmente como en un ratio de combinación de dosis de compuestos constante (PLR-56:4-OHT, 1:2,75 y PLR-67:4-OHT, 1:1,3). Las diluciones de los productos se duplicaron en un rango de concentraciones por encima y por debajo de los límites del ratio establecido. La inhibición de la viabilidad celular se comparó con el máximo efecto de supervivencia (ausencia de inhibición de la viabilidad celular) observado en células no tratadas (VEH). A esta variable se le asignó un valor entre 0 (no existe inhibición de la viabilidad celular) y 1 (100 % de inhibición de la viabilidad celular). Las curvas dosis-efecto de los compuestos individuales o de sus combinaciones respectivas con 4-OHT se representaron gráficamente y se analizaron mediante el método del isoblograma de Chou-Talalay (216) en el software del Calcsyn versión 2.0 (Biosoft, Cambridge, Reino Unido). El programa informático generó valores conocidos como índices de combinación, *combination index* (CI), que informaron sobre la existencia de fenómenos de sinergismo (valores < 1), adición (valores = 1) o antagonismo (valores >1). Los resultados de CI se calcularon para diferentes dosis efectivas (ED): ED<sub>25</sub>, ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub>, ED<sub>90</sub> a partir de la media ± SEM de diferentes experimentos.

## 17. Análisis matemático y estadístico

El análisis de datos se realizó con el programa GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados mostrados representan datos obtenidos, de entre dos y seis experimentos independientes, con al menos un triplicado en cada condición experimental. Estos resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) o alternativamente media  $\pm$  desviación estándar (SD). La comparación de medias entre grupos para estudiar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía usando test comparativos de medias grupales seguida de la prueba *post-hoc* de Bonferroni o mediante análisis comparativo de medias poblacionales mediante una T-Student de dos colas. Un p-valor inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) con un intervalo de confianza del 95 % fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

La concentración requerida para estimar una variable celular (viabilidad/proliferación/potencia antiestrogénica o citotoxicidad/potencia estrogénica) al 50% de su valor máximo (IC50 o EC50) se determinó gráficamente usando un algoritmo de ajuste de la curva de un modelo de regresión no lineal del GraphPad Prism 8.4.3. Las representaciones gráficas se establecieron, generalmente, a partir de la variable medida de respuesta normalizada de un producto, con respecto al logaritmo decimal de la concentración de este.

# **IV. RESULTADOS.**

## **CAPÍTULO I**







# Capítulo I

## **Cribado farmacológico de series químicas**

---

## 1. Cribado farmacológico de quimiotecas

El cribado farmacológico de las once quimiotecas se realizó mediante una estrategia PDD, con el fin de evaluar el potencial efecto antitumoral de los compuestos de estudio en diferentes estirpes celulares de cáncer de mama. Para ello, se determinaron sus efectos sobre la viabilidad celular mediante MTT. Posteriormente, para las últimas tres quimiotecas (PSx, LGx y PLRx) se realizó un cribado mixto, complementando los resultados de la estrategia PDD con una estrategia TDD (basado en la diana del ER $\alpha$ ). Esto permitió investigar las propiedades estro/antiestrogénicas de los compuestos mediante ensayos de gen reportero de luciferasa. Los resultados de todas las quimiotecas se presentan en forma de tablas y figuras.

### 1.1. Derivados de la embelina con núcleos de pirazol (PMA-Px) o acridina (PMA-Acx)

Los resultados del cribado farmacológico fenotípico de la serie química de los derivados de embelina con núcleos de tipo pirazol (PMA-Px) se presentan en la **Tabla 19** para las tres estirpes de células de cáncer de mama triple negativo (TNBC: BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) y en la **Tabla 20** para las células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3), y para las células no tumorales de riñón de mono (Vero).

**Tabla 19. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PMA-Px determinada por MTT en células TNBC.**

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 ( $\mu$ M)		S (%)		IC50 ( $\mu$ M)		S (%)		IC50 ( $\mu$ M)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PMA-P1	61,20	2,95	6,95	0,49	40,72	10,13	>10	nd	46,01	5,83	>10	nd
PMA-P2	10,50	12,44	>10	nd	0,00	0,00	>10	nd	0,00	0,00	>10	nd
PMA-P3	38,53	3,15	>10	nd	18,52	8,96	>10	nd	23,71	8,60	>10	nd
PMA-P4	62,48	3,69	7,50	0,57	36,68	5,55	>10	nd	43,04	10,74	>10	nd
PMA-P5	51,94	11,09	>10	nd	39,67	2,21	>10	nd	45,30	3,53	>10	nd
PMA-P6	66,46	3,90	3,25	0,92	41,68	6,79	>10	nd	51,77	3,65	>10	nd
PMA-P7	47,83	1,74	>10	nd	40,78	11,40	>10	nd	41,19	6,62	>10	nd
PMA-P8	61,36	4,72	3,40	0,14	45,40	7,40	>10	nd	49,67	0,64	>10	nd
PMA-P9	74,63	2,20	3,50	1,27	50,53	6,54	>10	nd	57,86	1,31	>10	nd
PMA-P10	75,57	5,70	3,30	0,14	49,97	1,42	>10	nd	49,54	5,16	>10	nd
PMA-P11	52,35	4,88	>10	nd	33,17	3,78	>10	nd	34,49	9,49	>10	nd
PMA-P12	48,14	15,90	>10	nd	43,53	0,15	>10	nd	51,68	1,23	>10	nd
PMA-P13	49,57	12,54	>10	nd	36,85	6,66	>10	nd	41,93	1,50	>10	nd
PMA-P14	72,94	4,05	3,55	0,64	48,28	2,89	>10	nd	55,44	4,22	>10	nd
PMA-P15a	11,28	6,76	>10	nd	0,00	0,00	>10	nd	0,00	0,00	>10	nd
PMA-P15b	48,40	14,77	>10	nd	52,03	3,72	>10	nd	47,09	14,35	>10	nd
PMA-P16a	1,30	1,84	>10	nd	9,27	1,20	>10	nd	0,00	0,00	>10	nd
PMA-P16b	57,61	5,04	>10	nd	33,54	13,69	>10	nd	12,28	8,38	>10	nd
PMA-P17	75,22	2,30	5,00	0,14	48,11	15,43	>10	nd	59,36	2,18	>10	nd
PMA-P18	18,08	6,02	>10	nd	9,39	6,55	>10	nd	7,81	11,04	>10	nd
PMA-P19	52,91	7,15	>10	nd	39,74	7,52	>10	nd	40,90	1,76	>10	nd



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 19 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PMA-Px determinada por MTT en células TNBC.

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PMA-P20	76,88	1,20	4,80	0,85	52,08	6,64	>10	nd	51,11	0,17	>10	nd
PMA-P21	52,20	13,61	>10	nd	32,68	4,94	>10	nd	50,02	4,33	>10	nd
PMA-P22	51,88	7,75	>10	nd	28,23	0,48	>10	nd	43,46	6,11	>10	nd
PMA-P23	65,97	5,90	8,85	0,35	39,38	3,04	>10	nd	47,00	15,66	>10	nd
PMA-P24	91,45	2,90	9,60	0,42	44,62	9,03	>10	nd	46,25	10,31	>10	nd
PMA-P25	78,76	6,20	7,80	1,13	46,38	2,08	>10	nd	58,55	1,18	>10	nd
PMA-P26	16,02	0,61	>10	nd	13,91	14,55	>10	nd	7,71	10,90	>10	nd
PMA-P27	58,98	4,63	>10	nd	45,48	6,27	>10	nd	50,13	3,67	>10	nd
PMA-P28	69,34	3,25	9,6	0,1	36,84	3,36	>10	nd	41,55	6,33	>10	nd
PMA-P29	83,41	4,79	4,6	2,8	46,27	6,86	>10	nd	55,80	5,18	>10	nd
PMA-P30	86,60	5,76	>10	nd	55,24	5,40	>10	nd	60,25	3,10	>10	nd
PMA-P31	45,67	9,39	>10	nd	35,07	5,22	>10	nd	25,84	3,55	>10	nd
PMA-P32	79,28	3,72	6,9	2,5	58,14	3,04	>10	nd	57,54	2,28	>10	nd
PMA-P33	62,84	7,43	>10	nd	47,85	3,69	>10	nd	50,85	3,88	>10	nd
PMA-P34	69,13	7,48	4,4	1,3	52,49	2,48	>10	nd	53,28	6,67	>10	nd
PMA-P35	25,50	5,00	>10	nd	13,20	5,36	>10	nd	10,57	8,27	>10	nd
PMA-P36	10,97	12,31	>10	nd	10,18	3,33	>10	nd	3,53	4,29	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

Tabla 20. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PMA-Px determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+, HER2+ y células no tumorales.

ID	MCF-7				SK-BR-3				Vero			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PMA-P1	56,46	4,20	>10	nd	62,07	1,14	3,50	0,28	56,98	3,61	1,88	1,58
PMA-P2	0,00	0,00	>10	nd	0,00	6,08	>10	nd	22,93	7,76	>25	nd
PMA-P3	39,09	5,49	>10	nd	46,02	1,62	>10	nd	20,30	6,83	24,89	0,16
PMA-P4	45,02	5,07	>10	nd	58,17	3,85	>10	nd	55,65	0,17	2,97	0,23
PMA-P5	44,94	7,01	>10	nd	58,96	1,63	>10	nd	49,10	3,11	2,03	1,23
PMA-P6	55,09	5,32	>10	nd	62,35	2,57	2,20	0,28	54,09	4,36	2,77	0,94
PMA-P7	34,27	6,58	>10	nd	55,54	3,53	>10	nd	60,70	8,77	1,97	0,83
PMA-P8	51,69	5,91	>10	nd	74,50	0,18	2,55	0,78	33,40	1,75	>25	nd
PMA-P9	54,71	8,33	3,25	1,91	65,50	2,04	1,85	0,21	57,92	3,89	2,03	0,95
PMA-P10	56,37	4,28	>10	nd	58,57	2,42	>10	nd	42,65	7,38	20,71	6,07
PMA-P11	34,86	22,73	>10	nd	41,83	6,71	>10	nd	57,32	7,56	9,87	2,74
PMA-P12	54,10	12,36	4,75	1,20	44,46	4,03	>10	nd	50,20	30,17	12,14	7,16
PMA-P13	45,43	8,49	>10	nd	46,02	0,80	>10	nd	28,20	2,39	>25	nd
PMA-P14	47,67	11,24	>10	nd	51,51	3,05	>10	nd	31,43	1,65	>25	nd



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 20 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PMA-Px determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+, HER2+ y células no tumorales.

ID	MCF-7				SK-BR-3				Vero			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PMA-P15a	0,71	1,00	>10	nd	0,00	4,57	>10	nd	15,29	10,39	>10	nd
PMA-P15b	54,86	5,59	>10	nd	61,49	0,69	3,55	0,78	23,40	3,66	>25	nd
PMA-P16a	19,40	3,35	>10	nd	19,40	3,35	>10	nd	39,33	11,39	>25	nd
PMA-P16b	38,63	2,91	>10	nd	64,08	1,29	5,55	1,06	19,75	15,39	>25	nd
PMA-P17	52,64	8,50	>10	nd	57,32	1,35	>10	nd	24,38	20,43	>25	nd
PMA-P18	15,09	9,34	>10	nd	10,06	0,67	>10	nd	13,04	9,35	>10	nd
PMA-P19	54,34	3,66	>10	nd	51,73	3,76	>10	nd	29,30	13,67	>25	nd
PMA-P20	45,96	1,23	>10	nd	62,47	3,41	2,20	0,57	41,16	25,02	>25	nd
PMA-P21	58,22	4,81	>10	nd	47,97	2,08	>10	nd	36,34	3,97	>25	nd
PMA-P22	39,02	0,42	>10	nd	64,51	2,95	6,00	1,98	31,18	8,32	>25	nd
PMA-P23	61,95	0,63	9,10	0,57	57,07	2,93	>10	nd	32,87	6,34	>25	nd
PMA-P24	49,88	6,18	>10	nd	65,60	3,00	1,50	1,27	50,78	8,20	12,32	0,11
PMA-P25	49,37	9,05	>10	nd	70,32	1,66	3,25	0,07	41,90	21,97	8,42	1,34
PMA-P26	0,00	4,41	>10	nd	3,88	5,48	>10	nd	9,93	10,80	>10	nd
PMA-P27	77,84	4,35	1,52	0,54	77,80	0,82	5,70	0,99	40,65	8,78	10,81	1,26
PMA-P28	82,92	1,97	2,14	0,08	66,73	5,80	7,25	2,33	18,87	13,43	>25	nd
PMA-P29	97,76	1,64	0,59	0,00	81,81	5,31	2,30	0,71	47,59	13,77	10,29	2,21
PMA-P30	94,02	2,02	0,96	0,19	83,70	2,32	2,01	1,12	44,82	10,43	11,44	1,25
PMA-P31	61,34	3,42	3,15	2,15	72,63	2,35	8,00	2,40	29,31	3,23	24,66	0,49
PMA-P32	78,52	6,54	0,93	0,74	92,26	2,35	2,30	0,42	42,76	10,74	13,69	8,56
PMA-P33	86,52	8,46	1,83	0,62	82,06	0,33	4,74	1,34	62,50	0,99	3,34	0,54
PMA-P34	81,68	3,25	0,85	0,03	92,13	2,22	2,40	0,28	16,88	23,87	>25	nd
PMA-P35	0,00	2,04	>10	nd	8,68	11,38	>10	nd	6,54	6,35	>10	nd
PMA-P36	0,00	8,26	>10	nd	10,86	4,41	>10	nd	9,16	11,61	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7), HER2+ (SK-BR-3) y el modelo no tumoral de riñón de mono (Vero) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

El cribado PDD de la serie PMA-Px identificó compuestos con actividad antitumoral variable en función de la línea celular de estudio. De este modo, 16 de los 36 compuestos de la serie mostraron valores de IC50 por debajo de 10 µM en células BT-549. Los productos PMA-P6, PMA-P8, PMA-P9, PMA-P10 o PMA-P14 fueron los más potentes con valores de IC50 entre 3,25–3,50 µM (Tabla 19). Sin embargo, en otras estirpes de cáncer de mama TNBC investigadas (células Hs 578T y MDA-MB231) se registró una baja actividad antitumoral a las dosis ensayadas (IC50 >10 µM) (Tabla 19). Además, 18 y 11 compuestos de la serie presentaron valores de IC50 inferiores a 10 µM en células SK-BR-3 y MCF-7, respectivamente (Tabla 20).



De forma general, las células SK-BR-3 fueron las más sensibles a la quimioteca de productos PMA-Px, destacando los compuestos PMA-P8, PMA-20 y PMA-P24 (Tabla 20). Cabe resaltar que estos mismos productos presentaron una actividad antitumoral considerablemente menor en células TNBC y ER+ (MCF-7) y una baja citotoxicidad en las células Vero (Tabla 20). Aunque la mayor parte de productos de esta serie mostró una baja eficacia antitumoral en las células MCF-7, los compuestos PMA-P29, PMA-P30, PMA-P32 y PMA-P34 presentaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar (nM) alto (IC<sub>50</sub> = 590–960 nM) en estas células. Para estos mismos compuestos se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (IC<sub>50</sub> = 2,0–2,4  $\mu\text{M}$  e IC<sub>50</sub> = 4,4–6  $\mu\text{M}$ ) en células SK-BR-3 y BT-549, respectivamente (Figura 39), y entre 4–30 veces más elevados en células Vero (Tabla 20). Sin embargo, cabe destacar que para otros productos de esta serie (PMA-P1, PMA-P4, PMA-P5, PMA-P6, PMA-P7, PMA-P8, PMA-P9, PMA-P33) se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (2,0 – 3,3  $\mu\text{M}$ ) en las células Vero (Tabla 20).

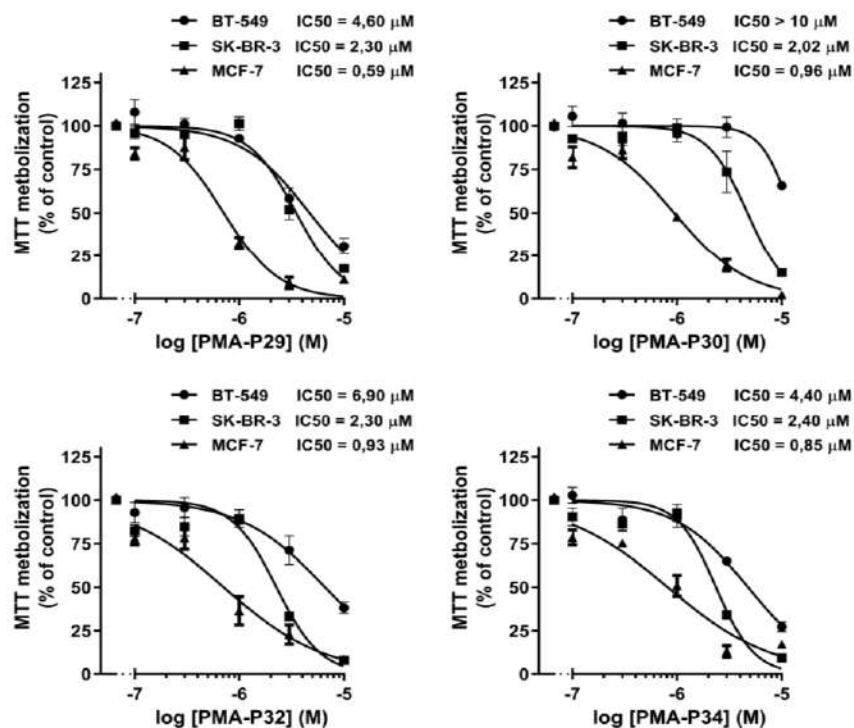


Figura 39. Gráficas dosis-efecto de los productos PMA-P29, PMA-P30, PMA-P32 y PMA-P34 en células MCF-7, SK-BR-3 y BT-549. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 48–72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC<sub>50</sub> para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes de células se representan como: ● para BT-549, ▲ para MCF-7 y ■ para SK-BR-3.

Los principales resultados del cribado farmacológico de esta serie química (PMA-Px) se incluyeron en la siguiente publicación: Martín-Acosta P, Amesty A, Guerra-Rodríguez M, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. Pharmaceuticals. 2021. doi: 10.3390/ph14101026 (148) (ver Anexo II).

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

El cribado farmacológico fenotípico de la serie química de los derivados de embelina con núcleos heterocíclicos tipo acridina (PMA-Acx) se presenta en la **Tabla 21** para las tres estirpes de células de cáncer de mama TNBC en las que fueron ensayados.

**Tabla 21. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PMA-Acx determinada por MTT en células TNBC.**

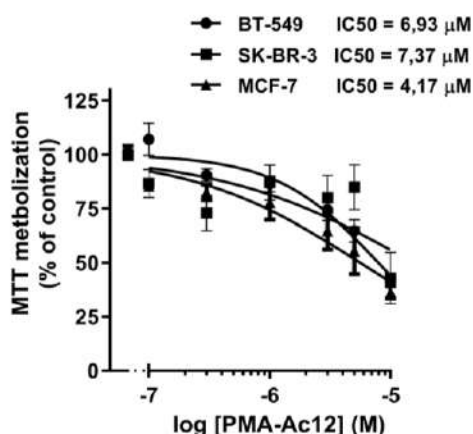
ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PMA-Ac1	0,00	22,18	>10	nd	12,55	5,89	>10	nd	0,00	2,40	>10	nd
PMA-Ac2	13,28	10,56	>10	nd	31,73	6,63	>10	nd	0,00	4,42	>10	nd
PMA-Ac3	47,53	4,59	>10	nd	36,97	2,57	>10	nd	20,02	5,61	>10	nd
PMA-Ac4	39,00	18,47	>10	nd	39,58	1,69	>10	nd	14,73	3,68	>10	nd
PMA-Ac5	62,77	17,73	>10	nd	28,75	3,26	>10	nd	15,04	7,94	>10	nd
PMA-Ac6	38,26	3,42	>10	nd	20,86	12,85	>10	nd	5,51	5,58	>10	nd
PMA-Ac7	0,00	6,04	>10	nd	28,89	1,11	>10	nd	12,92	10,53	>10	nd
PMA-Ac8	0,00	13,00	>10	nd	42,61	2,90	>10	nd	26,44	3,76	>10	nd
PMA-Ac9	0,00	21,14	>10	nd	39,81	8,17	>10	nd	28,99	3,27	>10	nd
PMA-Ac10	0,00	13,78	>10	nd	15,49	2,25	>10	nd	6,76	1,45	>10	nd
PMA-Ac11	34,78	14,28	>10	nd	26,18	8,93	>10	nd	34,60	2,98	>10	nd
PMA-Ac12	72,66	12,14	6,93	2,93	48,36	32,35	7,30	3,83	56,03	30,91	6,10	5,52
PMA-Ac13	56,81	29,43	>10	nd	5,90	2,50	>10	nd	28,00	8,37	>10	nd
PMA-Ac14	2,37	12,65	>10	nd	0,00	7,80	>10	nd	14,92	7,43	>10	nd
PMA-Ac15	36,32	26,04	>10	nd	32,93	1,01	>10	nd	20,27	4,15	>10	nd
PMA-Ac16	0,00	8,45	>10	nd	18,24	3,47	>10	nd	17,97	14,20	>10	nd
PMA-Ac17	0,00	4,95	>10	nd	13,56	9,00	>10	nd	23,64	6,85	>10	nd
PMA-Ac18	0,00	14,58	>10	nd	20,35	8,36	>10	nd	20,59	2,00	>10	nd
PMA-Ac19	14,19	11,78	>10	nd	14,25	5,26	>10	nd	101,34	2,25	>10	nd
PMA-Ac20	19,68	22,95	>10	nd	19,66	6,50	>10	nd	7,13	18,38	>10	nd
PMA-Ac21	56,21	4,98	>10	nd	12,09	8,81	>10	nd	10,34	17,04	>10	nd
PMA-Ac22	33,64	9,91	>10	nd	40,00	1,81	>10	nd	32,67	0,53	>10	nd
PMA-Ac23	43,42	8,44	>10	nd	20,63	0,81	>10	nd	28,09	6,74	>10	nd
PMA-Ac24	27,62	32,14	>10	nd	24,90	4,11	>10	nd	41,54	4,36	>10	nd
PMA-Ac25	0,00	25,08	>10	nd	13,61	5,10	>10	nd	25,29	4,89	>10	nd
PMA-Ac26	5,62	13,79	>10	nd	15,26	3,88	>10	nd	19,68	9,38	>10	nd
PMA-Ac27	23,86	18,43	>10	nd	14,43	5,81	>10	nd	28,93	0,79	>10	nd
PMA-Ac28	0,00	16,82	>10	nd	19,99	8,40	>10	nd	0,40	3,18	>10	nd
PMA-Ac29	2,04	12,15	>10	nd	12,28	11,25	>10	nd	0,00	1,24	>10	nd
PMA-Ac30	45,62	28,32	>10	nd	1,81	1,97	>10	nd	1,59	3,37	>10	nd
PMA-Ac31	0,00	15,56	>10	nd	0,00	5,85	>10	nd	1,78	9,19	>10	nd
PMA-Emb	0,00	5,89	>10	nd	40,50	5,98	>10	nd	29,49	9,75	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Por lo general, esta serie química mostró una baja actividad antitumoral en las estirpes de cáncer de mama TNBC evaluadas (valores de  $IC_{50} > 10 \mu M$ ). Solo uno de los compuestos, el PMA-Ac12, mostró un efecto antitumoral en el rango  $\mu M$  ( $IC_{50} = 6-7 \mu M$ ) (**Tabla 21**). Este producto mantuvo su actividad antitumoral en otras estirpes de cáncer de mama (HER2+ o ER+), con valores de  $IC_{50}$  similares para las primeras y un efecto antitumoral más potente en las últimas (MCF-7) (**Figura 40**).



**Figura 40.** Gráfica dosis-efecto del producto PMA-Ac12 en células MCF-7, SK-BR-3 y BT-549. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 48-72 h de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de  $IC_{50}$  para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes se representan como: ● para BT-549, ▲ para MCF-7 y ■ para SK-BR-3.

### 1.2. Compuestos espirodímeros (SPx)

Los resultados del cribado fenotípico de la serie química de los espirodímeros (SPx) se presentan en la **Tabla 22** para las células BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231.

**Tabla 22.** Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos SPx determinada por MTT en células TNBC.

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 ( $\mu M$ )		S (%)		IC50 ( $\mu M$ )		S (%)		IC50 ( $\mu M$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
SP-1	14,40	18,73	>10	nd	0,00	6,93	>10	nd	41,67	6,82	>10	nd
SP-2	14,56	20,04	>10	nd	0,00	2,62	>10	nd	29,54	8,61	>10	nd
SP-3	0,00	4,58	>10	nd	0,00	8,11	>10	nd	11,51	11,17	>10	nd
SP-4	0,00	10,79	>10	nd	14,85	4,52	>10	nd	29,00	12,11	>10	nd
SP-5	35,73	1,22	>10	nd	53,79	23,55	6,65	4,74	49,70	7,62	6,55	4,88
SP-6	21,59	4,04	>10	nd	3,20	14,26	>10	nd	26,18	5,23	>10	nd
SP-7	15,94	9,77	>10	nd	0,00	9,38	>10	nd	31,34	2,63	>10	nd
SP-8	17,67	8,00	>10	nd	4,39	8,19	>10	nd	23,04	6,41	>10	nd
SP-9	16,58	3,79	>10	nd	0,00	10,98	>10	nd	11,17	3,47	>10	nd
SP-10	10,60	2,84	>10	nd	3,56	5,89	>10	nd	49,61	5,66	>10	nd
SP-11	0,00	7,81	>10	nd	0,00	2,82	>10	nd	27,44	3,44	>10	nd

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 22 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos SPx determinada por MTT en células TNBC.

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
SP-12	11,05	4,28	>10	nd	23,12	4,39	>10	nd	27,03	5,30	>10	nd
SP-13	4,63	0,67	>10	nd	25,40	0,91	>10	nd	37,30	1,22	>10	nd
SP-14	11,18	3,94	>10	nd	20,56	8,59	>10	nd	10,45	3,60	>10	nd
SP-15	16,20	3,39	>10	nd	8,36	18,57	>10	nd	47,94	6,52	>10	nd
SP-16	14,33	2,32	>10	nd	21,52	23,45	>10	nd	24,15	6,63	>10	nd
SP-17	0,00	12,43	>10	nd	1,55	16,95	>10	nd	31,88	5,88	>10	nd
SP-18	9,90	1,75	>10	nd	16,58	8,72	>10	nd	52,03	2,92	>10	nd
SP-19	0,00	1,24	>10	nd	0,00	18,13	>10	nd	26,92	2,04	>10	nd
SP-20	0,00	11,08	>10	nd	17,77	10,53	>10	nd	23,80	2,78	>10	nd
SP-21	0,00	7,45	>10	nd	5,98	5,21	>10	nd	25,53	12,11	>10	nd
SP-22	2,70	3,54	>10	nd	13,29	0,78	>10	nd	37,56	12,19	>10	nd
SP-23	0,00	1,64	>10	nd	0,00	8,72	>10	nd	37,66	9,87	>10	nd
SP-24	1,29	7,36	>10	nd	0,00	17,25	>10	nd	34,58	7,86	>10	nd
SP-25	1,86	9,47	>10	nd	1,60	6,28	>10	nd	20,16	5,36	>10	nd
SP-26	0,00	4,69	>10	nd	13,80	6,93	>10	nd	35,25	12,10	>10	nd
SP-27	0,00	5,54	>10	nd	24,30	2,47	>10	nd	13,54	14,21	>10	nd
SP-28	8,61	18,90	>10	nd	22,75	10,93	>10	nd	35,50	9,68	>10	nd
SP-29	3,92	14,50	>10	nd	0,00	8,82	>10	nd	19,98	14,89	>10	nd
SP-30	13,17	10,81	>10	nd	2,60	14,32	>10	nd	45,83	12,36	>10	nd
SP-31	69,09	15,09	8,40	2,26	72,40	12,96	8,16	1,22	79,08	2,83	6,68	2,38
SP-32	0,19	12,55	>10	nd	0,00	4,85	>10	nd	38,37	3,87	>10	nd
SP-33	6,81	0,68	>10	nd	20,19	2,09	>10	nd	9,01	8,97	>10	nd
SP-34	11,50	10,31	>10	nd	4,02	2,89	>10	nd	30,62	4,26	>10	nd
SP-35	16,69	2,21	>10	nd	33,35	1,42	>10	nd	46,76	0,12	>10	nd
SP-36	19,10	0,92	>10	nd	37,33	4,07	>10	nd	37,17	11,17	>10	nd
SP-37	36,95	16,10	>10	nd	0,00	19,16	>10	nd	32,32	12,78	>10	nd
SP-38	40,50	6,71	>10	nd	0,59	0,42	>10	nd	36,48	3,67	>10	nd
SP-39	37,40	16,63	>10	nd	0,00	9,12	>10	nd	42,49	2,04	>10	nd
SP-40	15,87	4,92	>10	nd	0,00	12,10	>10	nd	40,00	2,33	>10	nd
SP-41	10,62	10,41	>10	nd	31,86	24,05	>10	nd	3,16	4,47	>10	nd
SP-42	5,66	8,36	>10	nd	1,78	4,25	>10	nd	8,24	13,04	>10	nd
SP-43	15,04	0,51	>10	nd	8,91	9,83	>10	nd	31,50	9,35	>10	nd
SP-44	31,36	0,29	>10	nd	20,69	11,42	>10	nd	40,72	4,50	>10	nd
SP-45	15,81	19,42	>10	nd	0,00	23,18	>10	nd	28,77	10,08	>10	nd
SP-46	33,74	1,35	>10	nd	12,13	19,28	>10	nd	40,72	9,35	>10	nd
SP-47	41,77	4,53	>10	nd	0,00	19,78	>10	nd	40,87	2,83	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).



En general, se identificaron compuestos con baja potencia antitumoral ( $IC_{50} > 10 \mu M$ ) en las líneas celulares TNBC evaluadas, a excepción de los espirodímeros SP-31 ( $IC_{50} = 6,70-8,40 \mu M$  en las tres líneas celulares) y SP-5 ( $IC_{50} = 6,55 \mu M$  y  $6,65 \mu M$  en células MDA-MB231 y Hs 578T, respectivamente) (Tabla 22). Estos productos fueron los más potentes de la serie y su efecto sobre la viabilidad celular se representa en la Figura 41. Aunque para el resto de los productos no se estimó un valor cuantitativo de  $IC_{50}$ , las células MDA-MB231 exhibieron una mayor sensibilidad para algunos de ellos (SP-10, SP-15, SP-18, SP-30, SP-35, SP-38, SP-39 SP-40, SP-44, SP-46 y SP-47), siendo capaces de inhibir la viabilidad celular en un 40–52 %. Las células BT-549 o Hs 578T fueron menos sensibles a los SPx (Tabla 22).

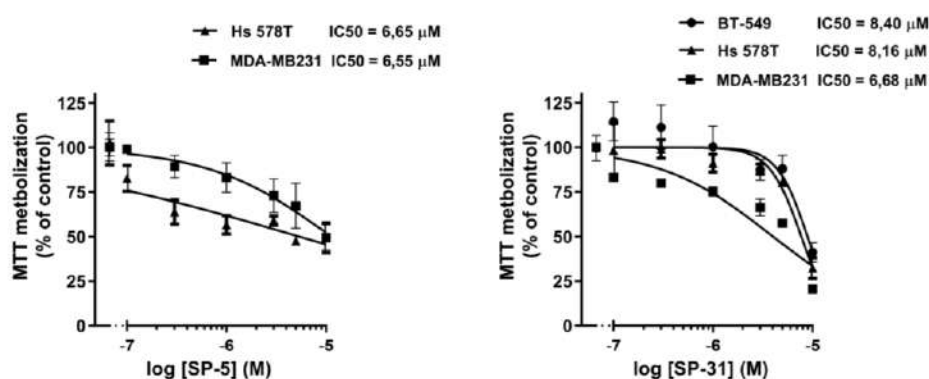


Figura 41. Gráficas dosis-efecto de los productos SP-5 y SP-31 en las líneas celulares TNBC. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 48 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de  $IC_{50}$  para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre los diferentes modelos celulares se representan como: ● para BT-549, ▲ para Hs 578T y ■ para MDA-MB231.

### 1.3. Compuestos basados en complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx)

La quimioteca de complejos metálicos con chalconas y lapachol (CMx) fue evaluada en primer lugar en células MCF-7 y SK-BR-3 (Tabla 23) mediante ensayos de MTT.

Tabla 23. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos CMx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC <sub>50</sub> (μM)		S (%)		IC <sub>50</sub> (μM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
NQ	13,41	3,37	>10	nd	0,00	5,83	>10	nd
NQCu(1)	30,05	6,75	>10	nd	0,00	5,27	>10	nd
NQNi(1)	8,28	8,18	>10	nd	13,51	4,54	>10	nd
NQZn(1)	0,00	7,32	>10	nd	22,48	1,66	>10	nd
NQMn(1)	19,25	10,30	>10	nd	10,23	6,39	>10	nd
NQCo(1)	26,97	1,54	>10	nd	0,00	3,45	>10	nd
NQCu(2)	27,85	3,43	>10	nd	19,60	5,71	>10	nd
Cuphen	49,54	5,54	>10	nd	85,61	7,51	4,05	0,62
Niphen	4,57	9,16	>10	nd	0,00	18,80	>10	nd



## IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 23 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos CMx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Znphen	95,00	6,13	6,96	1,07	101,78	6,04	2,29	0,88
Mnphen	96,30	6,44	5,44	0,62	100,37	8,18	4,45	2,47
Cophen	29,46	6,79	>10	nd	32,93	11,73	>10	nd
JG-1	17,01	3,95	>10	nd	13,35	9,28	>10	nd
JG-2	15,70	5,77	>10	nd	21,29	2,74	>10	nd
JG-3	0,00	2,96	>10	nd	13,45	4,99	>10	nd
JG-4	0,00	3,18	>10	nd	13,25	2,48	>10	nd
T-CH1-Cu	32,18	9,04	>10	nd	61,35	22,34	9,29	1,00
CH6-Cu	46,82	22,10	>10	nd	75,42	12,51	4,95	2,78
CH2-Cu	110,98	5,85	2,34	1,89	111,41	3,36	1,23	0,18
CH6-Ru	8,11	11,48	>10	nd	4,42	3,72	>10	nd
CH3-Cuphen	116,48	1,53	5,11	0,64	120,12	7,68	2,90	1,41
CH2-Ru	9,96	4,02	>10	nd	24,21	34,23	>10	nd
Cu-Lap	16,18	16,27	>10	nd	8,55	12,09	>10	nd
Co-Lap	101,42	3,54	2,20	0,31	104,83	19,30	3,92	0,78
[Cu(phen) (lap)2:CH2Cl2	112,44	4,64	3,89	1,17	115,06	10,31	4,11	1,57
CH8-Cu	105,77	3,41	1,52	0,40	109,37	1,67	0,43	0,32
CH10-Cu	68,76	5,87	8,88	1,58	90,14	20,63	5,79	0,34
CH9-Cu	88,84	14,01	3,96	2,79	68,23	19,16	6,78	2,82
Co-1	106,12	6,53	1,62	0,23	103,92	1,38	3,62	0,22
Co	74,88	12,06	>10	0,00	26,84	8,49	>10	nd
CH3-Cu	43,65	6,86	>10	0,00	118,18	0,21	5,01	1,20

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

Un tercio de los productos CMx (Znphen, Mnphen, CH6-Cu, CH3-Cuphen, Co-Lap, Co-1, CuphenLap2, CH10-Cu, CH9-Cu y CH3-Cu, entre ellos) presentaron actividad antitumoral en las líneas celulares estudiadas con valores de IC50 en el rango µM (IC50 = 3–10 µM) (**Tabla 23**). Estos resultados permitieron establecer ciertas relaciones estructura-actividad. De esta forma, los compuestos con átomos de cobalto en su estructura (Co-Lap y Co-1) presentaron una cierta selectividad para las células MCF-7, frente a la selectividad detectada para los complejos metálicos de cobre (Cuphen, CH6-Cu, CH2-Cu, CH3-Cuphen, CH8-Cu, CH10-Cu, CH3-Cu) en células SK-BR-3 (**Tabla 23**). Posteriormente, la quimioteca de productos CMx fue evaluada en células TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) (**Tabla 24**). Los resultados obtenidos ponen

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

de manifiesto, de manera general, una menor actividad antitumoral de estos productos en TNBC, en comparación con las otras estirpes de cáncer de mama. Sin embargo, cabe destacar que los productos Cuphen, Znphen, Mnphen, CH3-Cuphen, CuphenLap2 o CH8-Cu mostraron valores de IC50 en el rango  $\mu\text{M}$  en células TNBC ( $\text{IC}_{50} = 4\text{--}10 \mu\text{M}$ ) (Tabla 24).

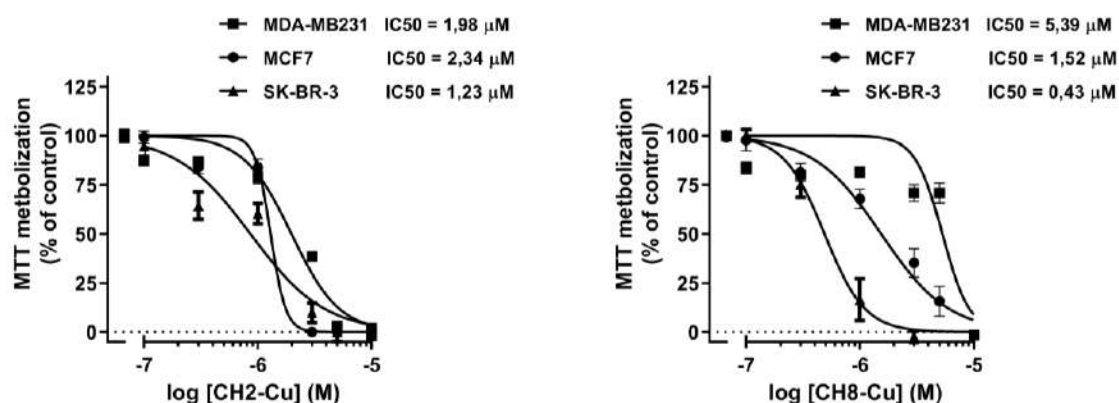
Tabla 24. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos CMx determinada por MTT en células TNBC.

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
NQ	6,46	8,54	>10	nd	2,15	11,44	>10	nd	19,35	15,85	>10	nd
NQCu(1)	12,19	6,29	>10	nd	9,17	9,72	>10	nd	4,49	8,90	>10	nd
NQNi(1)	6,01	17,86	>10	nd	0,00	3,49	>10	nd	0,00	8,84	>10	nd
NQZn(1)	6,52	5,15	>10	nd	0,11	3,32	>10	nd	0,00	1,88	>10	nd
NQMn(1)	20,96	2,61	>10	nd	13,05	5,48	>10	nd	0,00	5,80	>10	nd
NQCo(1)	21,60	4,47	>10	nd	0,00	6,29	>10	nd	5,03	17,60	>10	nd
NQCu(2)	25,34	11,72	>10	nd	0,00	7,64	>10	nd	8,25	9,99	>10	nd
Cuphen	71,85	7,42	9,75	0,36	69,69	33,03	6,23	1,10	75,89	20,92	4,36	1,44
Niphen	27,14	7,98	>10	nd	33,49	4,66	>10	nd	27,08	8,68	>10	nd
Znphen	47,25	12,44	>10	nd	45,18	24,25	>10	nd	62,24	7,76	5,41	0,09
Mnphen	58,06	12,06	>10	nd	43,89	22,84	>10	nd	65,45	15,22	3,54	0,08
Cophen	20,85	6,51	>10	nd	6,44	2,79	>10	nd	28,01	3,53	>10	nd
JG-1	21,52	1,11	>10	nd	14,98	4,37	>10	nd	0,00	18,43	>10	nd
JG-2	0,82	10,28	>10	nd	3,26	24,70	>10	nd	0,00	21,40	>10	nd
JG-3	25,28	3,43	>10	nd	0,00	28,13	>10	nd	0,00	7,68	>10	nd
JG-4	19,72	6,80	>10	nd	0,00	34,19	>10	nd	11,43	7,09	>10	nd
T-CH1-Cu	17,77	3,53	>10	nd	0,00	6,54	>10	nd	9,59	7,21	>10	nd
CH6-Cu	17,31	4,75	>10	nd	0,00	10,60	>10	nd	6,22	4,13	>10	nd
CH2-Cu	105,95	1,01	2,55	1,28	102,38	5,46	4,55	1,45	105,51	3,03	1,98	0,18
CH6-Ru	5,27	12,21	>10	nd	0,00	8,84	>10	nd	5,85	10,51	>10	nd
CH3-Cuphen	109,97	7,48	3,82	0,89	81,36	10,44	8,66	0,62	102,94	3,37	5,23	0,33
CH2-Ru	2,44	6,08	>10	nd	0,00	4,49	>10	nd	7,85	9,15	>10	nd
Cu-Lap	2,97	4,20	>10	nd	0,76	1,07	>10	nd	0,00	5,69	>10	nd
Co-Lap	40,42	4,52	>10	nd	14,78	3,29	>10	nd	55,01	1,01	>10	nd
[Cu(phen)(lap)2:CH2Cl2	2,01	6,49	>10	nd	0,00	14,54	>10	nd	84,17	6,25	6,73	0,09
CH8-Cu	97,30	6,07	5,67	1,20	96,04	3,50	5,27	0,04	101,35	2,60	5,39	0,94
CH10-Cu	16,36	6,57	>10	nd	9,67	15,56	>10	nd	22,76	10,14	>10	nd
CH9-Cu	42,30	4,53	>10	nd	52,96	3,22	>10	nd	41,09	3,70	>10	nd
Co-1	31,13	2,32	>10	nd	21,26	4,59	>10	nd	52,14	2,33	>10	nd
Co	13,36	2,71	>10	nd	19,85	5,00	>10	nd	28,95	4,52	>10	nd
CH3-Cu	12,58	5,68	>10	nd	21,26	19,36	>10	nd	13,24	5,12	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10  $\mu\text{M}$ ); y los valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10  $\mu\text{M}$ . En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10  $\mu\text{M}$  (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 ( $\mu\text{M}$ ) se presentan como media (M)  $\pm$  (SD).



La actividad antitumoral inducida por los productos con complejos de cobalto (Co-Lap o Co-1) en células MCF-7 no se reprodujo en células TNBC (**Tabla 24**). Aunque los compuestos con cobre en su estructura (CH2-Cu y CH8-Cu) presentaron valores inferiores de IC50 en células SK-BR-3, también mostraron una actividad antitumoral destacable en células ER+ y TNBC, con valores de IC50 en el rango  $\mu\text{M}$  bajo ( $\text{IC}_{50} = 1,52\text{--}5,39 \mu\text{M}$ ) (**Figura 42**).



**Figura 42.** Gráficas dosis-efecto de los productos CH2-Cu y CH8-Cu en las líneas celulares MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB231. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre los diferentes modelos celulares se representan con ● para MCF-7, ▲ para SK-BR-3 y ■ para MDA-MB231.

Los principales resultados del cribado farmacológico de los CMx se incluyeron en la siguiente publicación: Hernández-Molina R, Abramov A, González-Platas J, Oramas-Royo S, Estévez-Braun A, Guerra-Rodríguez M, Aranda-Tavío H, Guerra B, Fernández-Pérez L. Polyhedron. 2019. doi:1016/j.poly. 2019.03.010 (145) (ver Anexo II).

#### 1.4. Compuestos análogos a un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx)

Los resultados del cribado farmacológico fenotípico de análogos de un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx) se presentan en la **Tabla 25** para las células SK-BR-3 y MCF-7 y en la **Tabla 26** para las células TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231).

**Tabla 25.** Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos JKSTx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
JKST-1	67,63	5,60	1,88	1,98	74,46	5,26	8,10	2,69
JKST-2	28,81	4,46	>10	nd	28,78	9,09	>10	nd
JKST-3	22,89	23,18	>10	nd	30,08	6,19	>10	nd
JKST-4	59,30	8,42	>10	nd	81,58	2,77	7,13	1,46
JKST-5	29,54	4,57	>10	nd	43,55	14,63	>10	nd

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 25 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos JKSTx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
JKST-6	112,39	11,77	4,68	0,62	114,24	9,45	3,18	0,21
JKST-7	12,04	2,76	>10	nd	30,92	4,63	>10	nd
JKST-8	0,75	2,21	>10	nd	40,01	5,14	>10	nd
JKST-9	6,79	3,22	>10	nd	22,03	3,54	>10	nd
JKST-10	34,83	13,91	>10	nd	13,07	1,17	>10	nd
JKST-11	122,78	10,80	1,80	1,01	109,19	7,87	0,82	0,25
JKST-12	114,67	22,26	4,42	1,44	112,16	8,27	5,24	3,11
JKST-13	116,76	18,80	2,97	0,23	114,71	4,96	1,50	0,84
JKST-14	62,47	19,12	>10	0,00	32,75	0,20	>10	nd
JKST-15	81,37	18,10	8,50	2,12	70,12	6,86	5,35	0,49
JKST-16	26,58	5,10	>10	nd	35,81	3,37	>10	nd
JKST-17	25,82	5,37	>10	nd	34,33	2,98	>10	nd
JKST-18	48,81	2,62	>10	nd	38,73	5,30	>10	nd
JKST-19	18,18	2,99	>10	nd	34,53	8,42	>10	nd
JKST-20	23,57	9,23	>10	nd	13,24	5,74	>10	nd
JKST-21	55,91	6,28	>10	nd	97,29	5,51	3,81	0,79
JKST-22	53,47	5,07	>10	nd	49,88	8,64	>10	nd
JKST-23	20,09	2,87	>10	nd	59,55	6,96	>10	nd
JKST-24	0,00	3,37	>10	nd	34,12	6,49	>10	nd
JKST-25	94,25	27,22	2,99	2,07	94,33	10,83	3,33	2,29
JKST-26	55,34	3,44	>10	nd	57,87	4,76	>10	nd
JKST-27	78,44	21,64	0,25	0,03	47,99	3,88	>10	nd
JKST-28	73,54	9,51	2,06	0,88	39,99	7,77	>10	nd
JKST-29	12,31	9,08	>10	nd	15,51	13,27	>10	nd
JKST-30	16,41	10,95	>10	nd	4,08	11,50	>10	nd
JKST-31	19,76	7,91	>10	nd	1,00	8,07	>10	nd
JKST-32	28,31	7,65	>10	nd	4,52	4,76	>10	nd
JKST-33	17,81	5,81	>10	nd	4,92	12,94	>10	nd
JKST-34	13,12	5,54	>10	nd	10,31	6,91	>10	nd
JKST-35	108,29	3,21	4,73	0,98	118,91	7,19	1,98	1,18
JKST-36	0,00	5,92	>10	nd	6,68	3,99	>10	nd
JKST-37	0,00	5,75	>10	nd	0,00	22,67	>10	nd
JKST-38	0,00	9,45	>10	nd	0,00	12,50	>10	nd
JKST-39	99,75	6,40	1,80	0,95	116,09	5,93	3,00	0,86
JKST-40	38,66	4,14	>10	nd	36,47	2,11	>10	nd
JKST-41	102,48	6,84	2,74	2,02	116,82	6,27	1,39	0,40
JKST-42	19,47	7,45	>10	nd	48,54	6,91	>10	nd
JKST-43	58,37	0,59	>10	nd	48,34	1,16	>10	nd
JKST-44	0,00	0,73	>10	nd	6,43	10,30	>10	nd
JKST-45	2,82	5,65	>10	nd	7,09	11,40	>10	nd
JKST-46	0,00	6,19	>10	nd	6,94	8,47	>10	nd
JKST-47	0,00	0,75	>10	nd	0,00	17,07	>10	nd



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 25 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos JKSTx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
JKST-48	15,48	6,46	>10	nd	0,00	7,77	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

**Tabla 26. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos JKSTx determinada por MTT en células TNBC.**

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
JKST-1	20,00	8,88	>10	nd	20,00	1,94	>10	nd	36,00	1,40	>10	nd
JKST-2	21,00	5,43	>10	nd	6,00	0,86	>10	nd	0,00	2,94	>10	nd
JKST-3	58,00	4,10	>10	nd	34,54	6,60	>10	0,00	36,55	2,05	5,57	1,48
JKST-4	42,00	7,90	>10	nd	7,00	5,87	>10	nd	0,19	6,12	>10	nd
JKST-5	62,35	2,76	>10	nd	45,82	13,88	>10	0,00	55,97	24,00	4,04	1,36
JKST-6	103,76	2,94	1,99	0,87	100,26	18,80	3,25	1,20	103,40	6,47	2,70	1,31
JKST-7	44,00	6,24	>10	nd	24,00	4,28	>10	nd	10,00	10,84	>10	nd
JKST-8	0,00	5,10	>10	nd	3,00	12,80	>10	nd	0,00	3,21	>10	nd
JKST-9	5,00	2,47	>10	nd	10,00	8,40	>10	nd	0,00	5,16	>10	nd
JKST-10	54,40	15,70	>10	nd	51,99	6,70	>10	nd	45,10	1,13	7,85	3,05
JKST-11	104,08	0,83	3,18	1,36	101,83	6,67	1,93	0,86	92,26	1,83	1,74	0,66
JKST-12	103,00	11,31	2,62	0,33	109,87	6,90	2,60	1,10	98,77	13,05	2,14	0,27
JKST-13	107,30	3,75	3,07	0,05	114,07	4,47	1,95	0,71	98,70	3,25	2,40	0,72
JKST-14	91,65	1,47	3,23	1,09	85,55	38,82	6,50	4,95	98,37	15,03	3,93	0,47
JKST-15	51,18	8,66	3,96	4,21	69,09	17,37	6,25	5,30	84,18	16,59	3,82	0,40
JKST-16	0,00	6,95	>10	nd	4,00	11,66	>10	nd	0,00	11,37	>10	nd
JKST-17	56,20	16,69	>10	nd	67,25	26,23	6,67	4,71	56,00	2,93	>10	nd
JKST-18	83,00	14,14	6,03	5,61	59,43	8,03	>10	nd	32,98	2,37	>10	nd
JKST-19	36,20	10,40	>10	nd	19,00	8,16	>10	nd	13,62	13,86	>10	nd
JKST-20	26,95	13,71	>10	nd	10,00	6,82	>10	nd	0,00	9,56	>10	nd
JKST-21	28,59	9,02	>10	nd	20,00	12,42	>10	nd	1,00	12,44	>10	nd
JKST-22	40,48	14,59	>10	nd	29,00	10,75	>10	nd	27,00	2,66	>10	nd
JKST-23	33,81	4,86	>10	nd	35,00	3,97	>10	nd	0,00	17,52	>10	nd
JKST-24	0,00	6,86	>10	nd	0,00	3,32	>10	nd	0,00	10,06	>10	nd
JKST-25	86,36	8,80	8,53	0,38	60,49	4,02	2,89	1,43	68,13	6,59	>10	nd
JKST-26	33,76	7,55	>10	nd	39,52	6,78	>10	nd	31,41	0,98	>10	nd
JKST-27	59,57	21,07	>10	nd	58,43	7,63	>10	nd	60,20	5,94	8,15	2,62



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

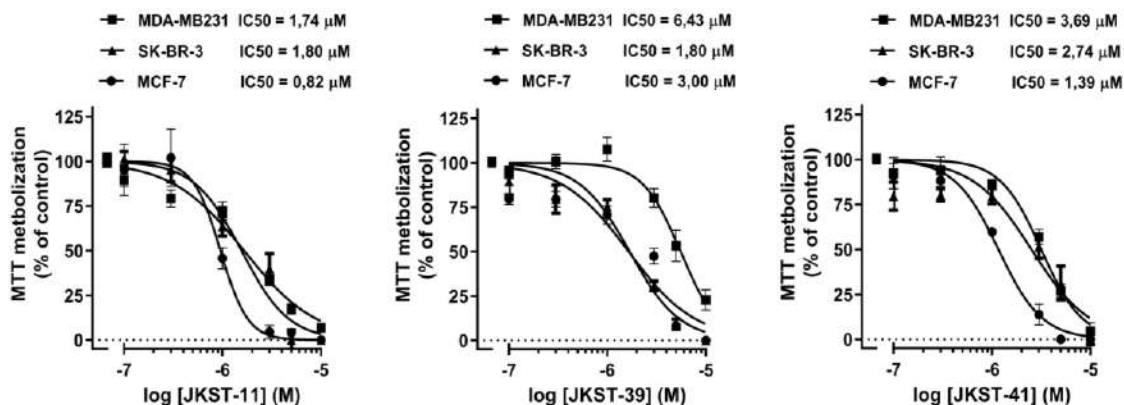
Tabla 26 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos JKSTx determinada por MTT en células TNBC.

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
JKST-28	51,02	8,49	>10	nd	66,72	7,12	>10	nd	49,91	31,41	>10	0,00
JKST-29	53,39	11,87	>10	nd	21,27	2,57	>10	nd	15,81	4,47	>10	nd
JKST-30	11,99	6,78	>10	nd	33,60	5,02	>10	nd	31,37	5,65	>10	nd
JKST-31	0,00	8,10	>10	nd	0,00	3,09	>10	nd	17,51	1,46	>10	nd
JKST-32	10,32	25,83	>10	nd	9,93	6,09	>10	nd	21,32	4,77	>10	nd
JKST-33	0,00	10,94	>10	nd	3,77	4,51	>10	nd	14,43	5,37	>10	nd
JKST-34	28,76	22,26	>10	nd	23,01	9,78	>10	nd	21,82	13,70	>10	nd
JKST-35	108,18	2,80	6,23	2,08	111,70	0,28	3,79	3,00	90,53	1,47	4,98	0,77
JKST-36	19,41	5,23	>10	nd	19,53	2,91	>10	nd	17,55	4,01	>10	nd
JKST-37	8,23	6,49	>10	nd	0,00	11,36	>10	nd	24,16	8,26	>10	nd
JKST-38	28,06	2,50	>10	nd	0,00	7,36	>10	nd	31,60	5,15	>10	nd
JKST-39	107,38	5,87	3,07	0,06	93,00	13,34	6,16	3,02	72,88	19,63	6,43	0,63
JKST-40	32,05	12,53	>10	nd	3,93	8,13	>10	nd	19,96	7,14	>10	nd
JKST-41	106,80	6,62	1,41	0,37	103,63	3,16	6,21	3,29	91,17	14,33	3,69	0,83
JKST-42	74,52	17,26	5,67	4,68	18,51	5,29	>10	nd	64,86	5,12	4,90	1,14
JKST-43	52,39	7,39	>10	nd	0,00	1,89	>10	nd	45,04	4,10	>10	nd
JKST-44	4,03	18,36	>10	nd	0,00	16,12	>10	nd	0,00	6,83	>10	nd
JKST-45	0,00	6,26	>10	nd	7,27	10,27	>10	nd	0,00	4,27	>10	nd
JKST-46	0,00	2,43	>10	nd	4,22	6,31	>10	nd	0,00	10,82	>10	nd
JKST-47	0,00	5,04	>10	nd	4,30	9,03	>10	nd	0,00	19,85	>10	nd
JKST-48	5,66	11,40	>10	nd	17,73	4,86	>10	nd	0,00	25,27	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

El grupo de compuestos JKSTx presentó una actividad antitumoral variable. Una cuarta parte de ellos inhibió la viabilidad celular con valores de IC50 inferiores a 10 µM en células MCF-7 y SK-BR-3 (Tabla 25). Sin embargo, algunos productos exhibieron selectividad frente a determinadas líneas celulares. Así, el compuesto JKST-27 presentó una clara selectividad por las células SK-BR-3 frente a las MCF-7, con valores de IC50 de 250 nM y > 10 µM, respectivamente (Tabla 25). Por el contrario, el producto JKST-11 mostró una cierta selectividad por las células MCF-7 en comparación con las células SK-BR-3, con valores de IC50 de 820 nM y 1,80 µM, respectivamente (Tabla 25). Determinados productos, como por ejemplo JKST-6, JKST-11, JKST-12, JKST-13 y JKST-41, fueron capaces de inhibir la viabilidad de células TNBC con valores de IC50 en el rango µM bajo (1,4–6,4 µM) (Tabla 26). Finalmente, los compuestos JKST-39 y JKST-41 presentaron también una destacada capacidad para interferir en el metabolismo

mitocondrial de las células cancerosas, con valores de IC<sub>50</sub> en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (IC<sub>50</sub> = 1,4–3,0  $\mu\text{M}$ ) tanto en células TNBC como HER2+/ER+ (**Figura 43**).



**Figura 43.** Gráficas dosis-efecto de los productos JKST-11, JKST-39 y JKST-41 en las líneas celulares MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB231. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC<sub>50</sub> para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes de células se representan como: ● para MCF-7, ▲ para SK-BR-3 y ■ para MDA-MB231.

Las relaciones estructura-actividad de los compuestos JKSTx identificaron que la inclusión de grupos metoxilo (O-CH<sub>3</sub>) en las moléculas incrementaba su actividad antitumoral, con respecto a la adición de otros grupos químicos como los aldehídos. Otras modificaciones químicas en el grupo cumarina permitieron obtener compuestos biológicamente relevantes. De esta forma, en el caso del JKST-6, el núcleo cumarina se sustituyó por una pirona, mientras que en el JKST-13 se sustituyó por una dimedona. La modificación estructural de la quinona en lugar de la cumarina, también permitió obtener dos compuestos, JKST-39 y JKST-41, con actividad antitumoral destacable tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en distintos tipos de leucemia (143).

La evaluación de los compuestos análogos al híbrido naftoquinona-cumarina en células Vero permitió investigar la potencial nefrotoxicidad de los compuestos más destacados de la serie mediante el cálculo de sus índices de citotoxicidad. Estos, calculados en términos de inhibición de la viabilidad celular, pusieron de manifiesto la selectividad de todos los productos seleccionados por las células tumorales frente a las no tumorales (**Tabla 27**).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 27. Índices de citotoxicidad (IC) calculados a partir de los resultados de inhibición de la viabilidad celular determinada por MTT en células Vero y en diferentes estirpes de cáncer de mama.**

ID	Vero vs MCF-7	Vero vs SK-BR-3	Vero vs BT-549	Vero vs Hs 578T	Vero vs MDA-MB231
JKST-6	1,95 ± 0,54	1,33 ± 0,40	3,49 ± 1,52	2,28 ± 1,43	2,99 ± 1,93
JKST-11	14,11 ± 6,10	7,26 ± 4,20	4,11 ± 2,46	6,39 ± 2,96	7,15 ± 3,90
JKST-12	2,1 ± 1,13	2,17 ± 0,80	3,5 ± 1,01	4,02 ± 1,88	4,28 ± 1,24
JKST-13	4,06 ± 2,10	1,73 ± 0,45	1,67 ± 0,43	2,94 ± 1,37	2,14 ± 1,15
JKST-39	5,84 ± 1,37	10,83 ± 4,66	5,48 ± 0,12	3,10 ± 1,24	2,63 ± 0,21
JKST-41	3,8 ± 5,16	2,54 ± 4,03	3,76 ± 5,01	0,95 ± 1,39	1,41 ± 1,89

Se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular y el valor promedio ± la desviación estándar (SD) de los IC resultantes del cociente entre los valores de IC50 obtenidos en células Vero y las diferentes estirpes de cáncer de mama estudiadas en la quimioteca de los productos JKSTx.

El cribado farmacológico de la serie de los JKSTx condujo a la selección del JKST-6 como producto líder. La descripción de sus principales características y los resultados de su estudio se incluyeron en la siguiente publicación: Aranda-Tavío H, Recio C, Martín-Acosta P, Guerra-Rodríguez M, Brito-Casillas Y, Blanco R, Junco V, León J, Montero JC, Gandullo-Sánchez L, McNaughton-Smith G, Zapata JM, Pandiella A, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112330 (147) (ver Anexo II).

#### 1.5. Compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridinona (Pym-1)

La quimioteca de compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridinona (Pym-1) fue evaluada tanto en células SK-BR-3 y MCF-7 (Tabla 28), como en distintas estirpes de células TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) (Tabla 29).

**Tabla 28. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PFx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PF-1	97,01	2,54	1,14	0,55	89,51	6,61	1,57	0,48
PF-2	19,57	0,76	>10	nd	41,47	5,10	>10	nd
PF-3	16,65	3,38	>10	nd	38,13	8,48	>10	nd
PF-4	14,19	6,61	>10	nd	40,38	6,93	>10	nd
PF-5	50,15	4,80	>10	nd	48,97	9,51	>10	nd
PF-6	91,84	3,48	1,38	0,52	90,28	10,23	1,63	0,70
PF-7	106,66	0,67	0,96	0,52	104,35	1,87	3,66	0,31
PF-8	100,82	1,64	3,69	1,12	94,74	4,30	4,54	0,83
PF-9	18,85	4,64	>10	nd	14,57	1,82	>10	nd
PF-10	110,21	4,51	1,66	0,19	107,20	1,39	2,39	0,78
PF-11	98,15	7,03	2,99	0,54	97,06	3,35	4,48	2,38
PF-12	106,90	7,25	2,26	0,35	105,54	2,21	2,29	0,32
PF-2.1	82,71	5,36	2,67	0,51	83,26	3,08	2,81	1,42



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 28 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PFx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PF-2.6	43,14	2,02	>10	nd	84,56	2,91	1,29	0,73
PF-2.7	84,46	5,65	4,00	1,39	103,44	1,74	0,92	0,21
PF-2.8	20,90	4,71	>10	nd	15,69	6,50	>10	nd
PF-3.1	82,62	7,03	4,88	2,60	94,14	7,93	4,18	2,77
PF-3.6	98,22	4,61	4,98	1,76	98,60	6,44	3,72	2,25
PF-3.7	73,46	6,80	7,78	2,81	55,85	4,38	>10	nd
PF-3.8	62,87	13,68	>10	0,00	36,91	7,62	>10	nd
PF-4.3	108,89	7,42	4,79	0,37	103,50	4,23	1,71	0,95
Pym-1	108,91	4,71	0,46	0,31	106,44	0,59	0,72	0,30

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) tras 72h de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

**Tabla 29. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PFx determinada por MTT en células TNBC.**

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PF-1	59,47	5,06	>10	nd	43,04	3,93	>10	nd	72,58	7,05	2,12	0,16
PF-2	36,54	3,47	>10	nd	37,00	8,19	>10	nd	42,96	3,04	>10	nd
PF-3	13,67	5,72	>10	nd	5,36	2,71	>10	nd	26,72	2,47	>10	nd
PF-4	31,73	2,72	>10	nd	15,46	3,86	>10	nd	30,98	3,74	>10	nd
PF-5	28,30	2,70	>10	nd	32,27	5,27	>10	nd	33,64	4,23	>10	nd
PF-6	46,11	1,43	>10	nd	43,72	2,99	>10	nd	67,35	3,47	4,70	2,65
PF-7	88,92	8,32	5,69	0,65	59,26	4,30	>10	nd	80,29	10,02	5,78	0,39
PF-8	53,34	17,19	>10	0,00	37,19	4,89	>10	nd	11,84	6,20	>10	nd
PF-9	0,00	8,08	>10	nd	11,09	7,05	>10	nd	5,38	5,77	>10	nd
PF-10	101,99	3,25	2,91	1,77	104,50	0,80	1,82	0,69	100,75	2,54	1,10	0,35
PF-11	68,39	8,45	6,85	2,00	36,40	3,21	>10	nd	55,84	1,18	>10	nd
PF-12	93,90	12,44	3,47	0,81	86,28	10,42	3,07	2,38	86,38	8,68	2,01	1,47
PF-2.1	67,97	8,40	7,07	0,75	52,17	3,83	>10	nd	59,96	1,98	>10	nd
PF-2.6	28,76	7,21	>10	nd	11,14	5,19	>10	nd	20,16	15,32	>10	nd
PF-2.7	72,24	18,78	7,89	2,99	25,18	5,38	>10	nd	86,15	10,82	6,28	0,41
PF-2.8	3,53	7,06	>10	nd	0,00	4,42	>10	nd	0,09	10,91	>10	nd
PF-3.1	46,15	3,37	>10	nd	56,17	3,57	>10	nd	43,12	8,29	>10	nd
PF-3.6	40,13	2,76	>10	nd	44,30	7,04	>10	nd	54,51	2,82	>10	nd
PF-3.7	18,48	3,87	>10	nd	16,08	5,24	>10	nd	25,92	3,88	>10	nd
PF-3.8	16,54	4,93	>10	nd	0,00	15,02	>10	nd	0,00	4,07	>10	nd
PF-4.3	79,15	16,57	8,36	0,40	101,19	3,55	3,37	1,39	92,61	2,17	4,02	1,44

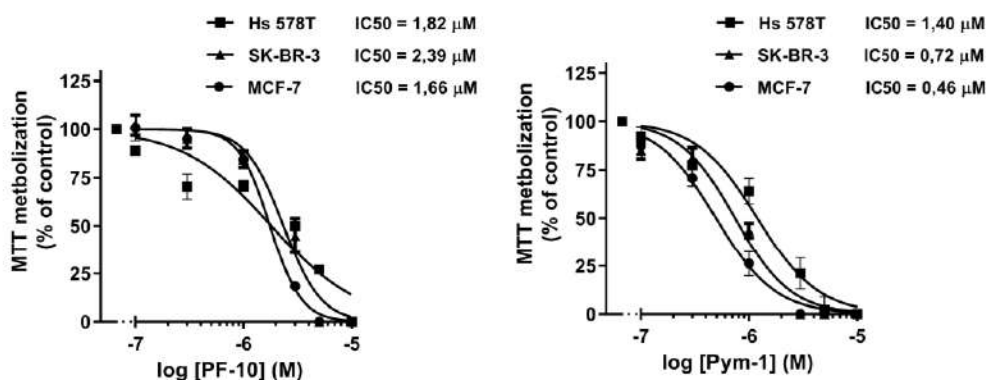
**Tabla 29 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PFx determinada por MTT en células TNBC.**

ID	BT-549				Hs 578T				MDA-MB-231			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<b>Pym-1</b>	105,82	1,23	0,85	0,20	106,86	3,65	1,40	1,11	105,08	4,15	1,00	0,63

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre tres líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549, Hs 578T y MDA-MB-231) tras 48 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10  $\mu\text{M}$ ); y los valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10  $\mu\text{M}$ . En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10  $\mu\text{M}$  (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 ( $\mu\text{M}$ ) se presentan como media (M)  $\pm$  (SD).

Estos experimentos permitieron detectar 13 productos que presentaban actividad antitumoral en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SK-BR-3, con valores de IC50 en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (IC50 = 0,46–5  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 28). Destaca el producto PF-7, que presentó una importante selectividad para el cáncer de mama ER+ (IC50 = 0,96  $\mu\text{M}$ ); sin embargo, los valores de IC50 en células HER2+ y TNBC fueron 4 y 6 veces más altos, respectivamente (Tablas 28 y 29). Este cierto grado de selectividad antitumoral hacia el cáncer de mama ER+ no se observó para los productos PF-2.6 y PF-2.7, cuyos valores de IC50 fueron entre 2 y 6 veces menores para las células HER2+, que para las células de cáncer de mama ER+ y TNBC (Tablas 28 y 29).

En general, la quimioteca de los PFx mostró escasa actividad antitumoral en las líneas celulares TNBC evaluadas (Tabla 29). Cabe destacar, sin embargo, que los productos PF-10 y Pym-1 presentaron una actividad antitumoral relevante, reduciendo la viabilidad de todas las estirpes celulares de cáncer de mama evaluadas (TNBC, HER2+ y ER+) con una potencia similar (Figura 44).



**Figura 44. Gráficas dosis-efecto de los productos PF-10 y Pym-1 en las líneas celulares MCF-7, SK-BR-3 y Hs-578T.** Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 para las tres estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes de células se representan como: ● para MCF-7, ▲ para SK-BR-3 y ■ para Hs-578T.



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Teniendo en cuenta los resultados previos, se procedió a estudiar adicionalmente, el efecto del producto Pym-1 sobre la viabilidad celular en otras estirpes celulares tumorales (tumores sólidos y hematológicos) y no tumorales (**Tabla 30**).

**Tabla 30. Resultados de inhibición de la viabilidad celular del tratamiento con Pym-1 determinada por MTT en distintas células tumorales y no tumorales.**

ID	Tipo de línea celular	S (%)		IC50 (μM)	
		M	SD	M	SD
BT-549	Cáncer de mama TNBC	105,82	1,23	0,85	0,20
Hs 578T	Cáncer de mama TNBC	106,86	3,65	1,40	1,11
MDA-MB231	Cáncer de mama TNBC	105,08	4,15	1,00	0,63
T47D	Cáncer de mama ER+	103,00	0,00	1,35	0,94
MCF-7	Cáncer de mama ER+	108,91	4,71	0,46	0,31
SK-BR-3	Cáncer de mama HER2+	106,44	0,59	0,72	0,30
Ishikawa	Cáncer de endometrio ER+	113,02	7,74	0,37	0,22
HEL	Eritroleucemia	103,954	2,960	2,03	1,15
K562	Leucemia mieloide crónica	105,774	2,936	2,14	1,29
RAW 264.7	Macrófagos murinos	93,760	3,839	1,71	nd
Vero	Células de riñón de mono sanas	78,56	5,04	5,45	1,56

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre distintas estirpes celulares tumorales (BT-549, Hs 578T, MDA-MB-231, SK-BR-3, T47D, MCF-7, Ishikawa, HEL y K562) y células no tumorales (RAW 264.7 y Vero). Se incluye el nombre identificativo de la línea celular (ID); el tipo de línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular a 10 μM, (S (%)); y los valores de IC50 (μM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50 %. Los datos de S (%) e IC50 (μM) se presentan como media (M) ± desviación estándar de la media (SD).

Los resultados obtenidos evidenciaron que Pym-1 inhibió eficazmente la viabilidad de células de cáncer de mama, endometrio y leucemia. Además, el compuesto también redujo la viabilidad celular de macrófagos murinos (RAW 264.7), pero presentó baja toxicidad en células renales sanas (Vero), con valores de IC50 entre 2 y 15 veces más altos que los obtenidos en los modelos tumorales estudiados (**Tabla 30**).

#### 1.6. Compuestos tipo antraquinonas (PCKx)

Los resultados del cribado PDD de la serie química de antraquinonas simplificadas (PCKx) realizado en células BT-549, T47D e Ishikawa, se presentan en la **Tabla 31**. En general, se observó una débil actividad antitumoral para la serie química de compuestos PCKx en las tres estirpes celulares estudiadas (**Tabla 31**). Sólo para dos productos, PCK-13 y PCK-16, se obtuvieron valores de IC50 inferiores a 10 μM en células T47D, lo que sugiere una cierta selectividad por esta línea ER dependiente (**Tabla 31 y Figura 45**). En las otras dos líneas celulares, aunque existen productos que redujeron la viabilidad celular hasta en un 40-50 % en el cribado a dosis única, no se pudieron calcular sus respectivos valores de IC50 en los experimentos de dosis-efecto, debido a su escasa potencia antitumoral a las dosis testadas (**Tabla 31**).

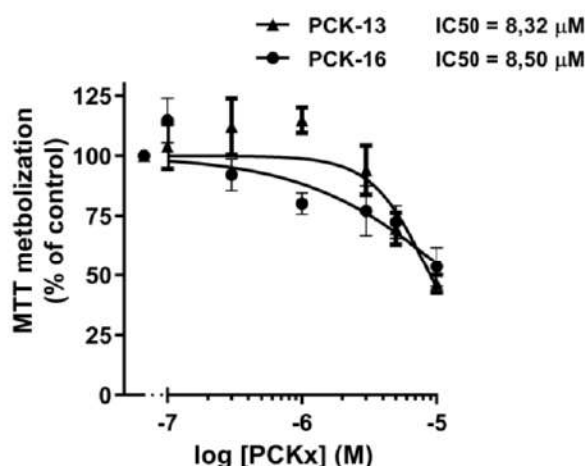
IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 31. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PCKx determinada por MTT en células TNBC y ER+ de mama y endometrio.

ID	BT-549				T47D				Ishikawa			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PCK-1	0,94	12,91	>10	nd	9,02	6,84	>10	nd	0,00	10,49	>10	nd
PCK-2	8,68	12,09	>10	nd	10,32	19,76	>10	nd	45,05	8,32	>10	nd
PCK-3	0,00	7,08	>10	nd	49,60	23,62	>10	nd	41,19	8,16	>10	nd
PCK-4	0,00	10,36	>10	nd	48,56	6,87	>10	nd	43,24	5,76	>10	nd
PCK-5	0,00	8,80	>10	nd	35,81	5,92	>10	nd	41,77	8,26	>10	nd
PCK-6	18,35	8,64	>10	nd	27,27	1,96	>10	nd	25,49	7,70	>10	nd
PCK-7	24,82	10,48	>10	nd	42,19	8,53	>10	nd	0,00	13,82	>10	nd
PCK-8	35,77	4,56	>10	nd	36,49	6,01	>10	nd	0,00	10,72	>10	nd
PCK-9	10,66	8,55	>10	nd	35,58	6,43	>10	nd	42,91	6,40	>10	nd
PCK-10	3,37	2,35	>10	nd	23,75	4,63	>10	nd	13,10	6,04	>10	nd
PCK-11	0,00	3,01	>10	nd	6,03	7,48	>10	nd	17,85	7,07	>10	nd
PCK-12	0,00	2,89	>10	nd	21,12	5,52	>10	nd	57,53	7,32	>10	nd
PCK-13	0,00	7,82	>10	nd	69,98	9,30	8,32	2,38	16,27	12,76	>10	nd
PCK-14	2,59	13,89	>10	nd	44,77	11,10	>10	nd	43,30	5,97	>10	nd
PCK-15	0,00	22,11	>10	nd	48,97	10,80	>10	nd	57,01	0,20	>10	nd
PCK-16	4,16	21,89	>10	nd	61,12	2,59	8,50	2,12	54,40	2,69	>10	nd
PCK-17	16,00	5,74	>10	nd	31,66	5,94	>10	nd	58,27	1,95	>10	nd
PCK-18	3,05	17,87	>10	nd	19,23	11,84	>10	nd	50,17	4,10	>10	nd
PCK-19	0,00	7,39	>10	nd	16,67	9,96	>10	nd	10,16	8,54	>10	nd
PCK-20	0,00	6,12	>10	nd	-5,61	9,24	>10	nd	0,59	11,20	>10	nd
PCK-21	3,15	16,22	>10	nd	7,38	13,36	>10	nd	21,26	18,54	>10	nd
PCK-22	0,00	8,55	>10	nd	1,96	15,02	>10	nd	24,42	16,14	>10	nd
PCK-23	0,00	7,47	>10	nd	23,15	13,10	>10	nd	25,30	12,38	>10	nd
PCK-24	0,00	8,77	>10	nd	7,40	14,26	>10	nd	0,07	12,12	>10	nd
PCK-25	1,99	14,71	>10	nd	24,45	12,06	>10	nd	0,00	9,71	>10	nd
PCK-26	0,00	10,98	>10	nd	3,32	11,12	>10	nd	1,82	14,08	>10	nd
PCK-27	0,00	17,50	>10	nd	-5,10	9,00	>10	nd	0,00	9,24	>10	nd
PCK-28	0,00	12,52	>10	nd	2,58	3,39	>10	nd	12,61	5,87	>10	nd
PCK-29	0,00	10,52	>10	nd	23,04	5,25	>10	nd	39,07	4,70	>10	nd
PCK-30	0,00	9,42	>10	nd	26,77	7,71	>10	nd	33,89	7,19	>10	nd
PCK-31	0,00	15,87	>10	nd	37,95	7,84	>10	nd	46,92	10,23	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549), ER+ (T47D) y cáncer de endometrio ER+ (Ishikawa) tras 48–72 h de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).





**Figura 45.** Gráfica dosis-efecto de los productos PCK-13 y PCK-16. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT en células T47D, tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 para cada producto a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas se representan como: ▲ para PCK-13 y ● para PCK-16.

### 1.7. Compuestos análogos simplificados de la marmicina A (MARx)

Los resultados del cribado farmacológico PDD de la serie química de los análogos simplificados de la marmicina A (MARx) se presentan para las células BT-549, T47D e Ishikawa en la **Tabla 32**.

**Tabla 32.** Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos MARx determinada por MTT en células TNBC y ER+ de mama y endometrio.

ID	BT-549				T47D				Ishikawa			
	S (%)		IC50 (μM)		S (%)		IC50 (μM)		S (%)		IC50 (μM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
MAR-1	23,47	9,89	>10	nd	49,93	4,73	>10	nd	59,04	14,59	3,57	0,33
MAR-2	16,93	0,75	>10	nd	54,74	3,81	>10	nd	45,79	8,73	>10	nd
MAR-3	7,82	10,25	>10	nd	36,43	11,26	>10	nd	51,25	5,33	>10	nd
MAR-4	5,31	6,75	>10	nd	18,01	7,92	>10	nd	48,21	1,53	>10	nd
MAR-5	0,00	4,78	>10	nd	19,93	8,93	>10	nd	30,36	7,93	>10	nd
MAR-6	12,45	14,35	>10	nd	29,03	11,23	>10	nd	77,91	4,88	2,31	1,70
MAR-7	0,00	12,82	>10	nd	43,44	10,92	>10	nd	39,78	12,48	>10	nd
MAR-8	0,00	14,01	>10	nd	39,31	6,27	>10	nd	79,25	15,64	4,10	3,95

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre líneas celulares de cáncer de mama TNBC (BT-549), ER+ (T47D) y cáncer de endometrio ER+ (Ishikawa) tras 48–72 h de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 μM); y los valores de IC50 (μM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 μM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 μM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (μM) se presentan como media (M) ± (SD).

En general, los resultados obtenidos para la serie MARx muestran compuestos con escasa actividad antitumoral en células BT-549 y T47D, con valores de inhibición de la viabilidad celular inferiores al 50 % (Tabla 32). Sin embargo, cuando esta quimioteca fue evaluada en células endometriales cancerosas ER+ (Ishikawa), se obtuvieron valores de IC50 en el rango  $\mu\text{M}$  bajo ( $3,57 \mu\text{M}$ ;  $2,31 \mu\text{M}$  y  $4,10 \mu\text{M}$ ) para los compuestos MAR-1, MAR-6 y MAR-8, respectivamente (Figura 46).

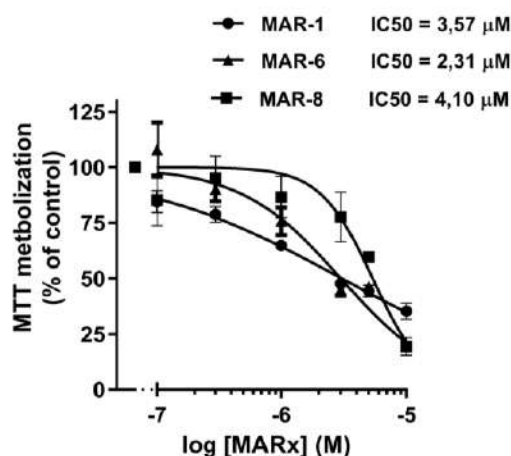


Figura 46. Gráfica dosis-efecto de los productos MAR-1, MAR-6 y MAR-8 en células Ishikawa. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT en células Ishikawa, tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 para cada producto a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas se representan como: ● para MAR-1, ▲ para MAR-6 y ■ para MAR-8.

### 1.8. Compuestos derivados de la piritildiona (Rx-Pyr)

La quimioteca de compuestos derivados de la piritildiona (Rx-Pyr) fue evaluada en células MCF-7 y T47D mediante ensayos de MTT (Tabla 33). En general, se observó un nulo o escaso efecto de estos compuestos sobre la viabilidad celular.

Tabla 33. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos Rx-Pyr determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+.

ID	MCF-7				T47D			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
R1	0,00	1,58	>10	nd	15,05	9,09	>10	nd
R2	0,00	9,20	>10	nd	26,34	7,13	>10	nd
R3	18,67	6,89	>10	nd	27,01	18,95	>10	nd
R4	2,27	12,13	>10	nd	0,00	14,72	>10	nd
R5	0,00	8,55	>10	nd	0,00	9,09	>10	nd
R6	0,63	2,69	>10	nd	0,00	7,89	>10	nd
R8	0,00	11,75	>10	nd	12,35	9,48	>10	nd
R9	0,00	4,25	>10	nd	4,74	18,74	>10	nd
R11	0,00	8,02	>10	nd	17,75	8,90	>10	nd
R12	6,38	11,48	>10	nd	31,28	12,83	>10	nd
R16	17,35	11,53	>10	nd	29,96	6,19	>10	nd

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 33 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos Rx-Pyr determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+.**

ID	MCF-7				T47D			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Pyr	7,28	2,66	>10	nd	2,03	1,44	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7 y T47D) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

### 1.9. Compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx)

#### 1.9.1. Cribado farmacológico mixto

La serie química de los compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles (PSx) fue sometida a un cribado farmacológico mixto (PDD y TDD). En primer lugar, los productos PSx fueron evaluados fenotípicamente, determinando su potencial efecto sobre la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento en dos líneas celulares de cáncer de mama ER+ (T47D y MCF-7) crecidas en medio completo (Tabla 34).

**Tabla 34. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PSx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+.**

ID	MCF-7				T47D			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
DOXO	96,35	8,96	0,06	0,03	100,47	2,48	0,16	0,05
4-OHT	75,60	4,86	4,69	2,85	88,91	13,81	6,06	0,36
ICI	80,73	6,52	0,04	0,04	73,43	7,39	16,37	12,20
PS-1	11,88	12,96	>10	nd	5,17	7,31	>10	nd
PS-2	7,20	2,46	>10	nd	3,90	5,51	>10	nd
PS-3	23,82	15,24	>10	nd	7,67	10,84	>10	nd
PS-4	15,37	6,43	>10	nd	0,00	4,02	>10	nd
PS-5	5,49	12,34	>10	nd	0,00	12,61	>10	nd
PS-6	16,19	18,09	>10	nd	20,87	10,23	>10	nd
PS-7	1,18	4,88	>10	nd	0,00	21,30	>10	nd
PS-8	12,77	18,05	>10	nd	5,72	11,23	>10	nd
PS-9	62,65	21,98	5,04	2,98	62,91	27,97	4,80	2,55
PS-10	43,40	23,55	>10	nd	0,00	4,23	>10	nd
PS-11	38,81	28,59	>10	nd	3,30	12,80	>10	nd
PS-12	25,48	18,78	>10	nd	0,00	4,44	>10	nd



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

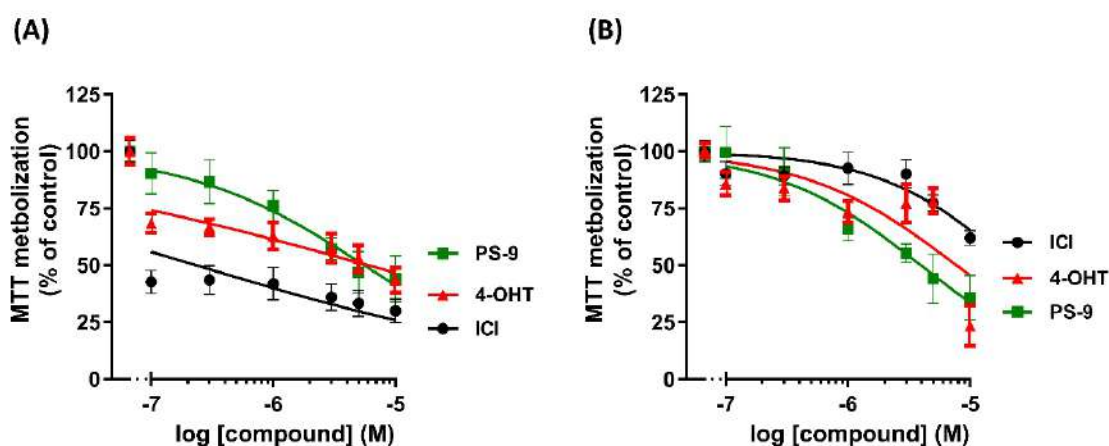
**Tabla 34 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PSx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+.**

ID	MCF-7				T47D			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PS-13	34,08	25,06	>10	nd	19,86	7,28	>10	nd
PS-14	29,41	24,34	>10	nd	0,00	1,64	>10	nd
PS-15	38,90	2,23	>10	nd	39,74	22,50	>10	nd
PS-16	22,27	3,85	>10	nd	0,00	11,56	>10	nd
PS-17	35,52	7,08	>10	nd	43,01	28,07	>10	nd
PS-18	18,28	19,47	>10	nd	0,00	28,32	>10	nd
PS-19	33,57	24,42	>10	nd	6,54	12,78	>10	nd
PS-20	2,20	18,57	>10	nd	0,00	0,10	>10	nd
PS-21	17,03	20,84	>10	nd	0,00	24,00	>10	nd
PS-22	8,75	4,20	>10	nd	4,94	9,54	>10	nd
PS-23	42,22	0,01	>10	nd	48,90	20,81	>10	nd
PS-24	30,66	10,01	>10	nd	22,15	11,72	>10	nd
PS-25	48,29	3,84	>10	nd	44,96	29,00	>10	nd
PS-26	0,00	5,42	>10	nd	0,00	15,79	>10	nd
PS-27	29,18	3,80	>10	nd	0,00	16,16	>10	nd
PS-28	7,51	12,20	>10	nd	3,48	10,28	>10	nd
PS-29	0,00	13,34	>10	nd	0,78	12,85	>10	nd
PS-30	0,00	1,22	>10	nd	0,00	1,66	>10	nd
PS-31	8,46	9,23	>10	nd	27,56	26,78	>10	nd
PS-32	0,00	12,18	>10	nd	5,68	19,55	>10	nd
PS-33	0,00	10,85	>10	nd	1,46	14,10	>10	nd
PS-34	10,77	12,87	>10	nd	2,84	14,20	>10	nd
PS-35	19,97	10,54	>10	nd	8,03	11,36	>10	nd
PS-36	17,76	6,12	>10	nd	2,88	11,65	>10	nd
PS-37	25,21	3,33	>10	nd	11,12	9,54	>10	nd
PS-38	19,72	3,12	>10	nd	8,38	5,37	>10	nd
PS-39	38,50	5,93	>10	nd	11,17	2,07	>10	nd
PS-40	17,29	7,61	>10	nd	17,03	0,52	>10	nd
PS-41	40,22	6,63	>10	nd	49,99	13,85	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7 y T47D) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Se emplearon como controles positivos de inhibición de la viabilidad los compuestos DOXO, 4-OHT e ICI. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).



En general, los compuestos de esta serie produjeron una inhibición de la viabilidad celular inferior al 30 % en ambas líneas celulares estudiadas (**Tabla 34**). Sin embargo, algunos pirazoles, como, por ejemplo, PS-10, PS-11, PS-13, PS-15, PS-17, PS-23, PS-25, PS-39 y PS-41 redujeron la viabilidad de las células MCF-7 en un 35–45 %, y otros, como PS-15, PS-17, PS-23, PS-25 y PS-41, mostraron valores de inhibición de la viabilidad hasta un máximo del 50 % en células T47D (**Tabla 34**). El producto de mayor potencia antitumoral registrada fue el PS-9, con una inhibición de la viabilidad celular a dosis única superior al 60 % y con valores de IC<sub>50</sub> cercanos a 5  $\mu$ M en ambas líneas celulares estudiadas (**Figura 47**).



**Figura 47.** Gráficas dosis-efecto del producto PS-9 en células de cáncer de mama ER+. Representación gráfica de la inhibición de la viabilidad celular determinada en experimentos de MTT en (A) células MCF-7 y (B) T47D tras 72 horas de tratamiento con medio completo. Se calculó un valor medio de IC<sub>50</sub> para el PS-9, ICI y 4-OHT en cada estirpe tumoral a partir de las réplicas experimentales.

En segundo lugar, la librería de compuestos PSx fue sometida a un cribado TDD basado en la diana del ER $\alpha$ , en células T47D-KBluc mediante ensayos transcripcionales de gen reportero de luciferasa. Esto permitió identificar compuestos con capacidad de modular la actividad del ER $\alpha$ , a través de la detección de actividades estrogénicas, antiestrogénicas y mixtas (**Tabla 35**). Los resultados mostraron una potente actividad agonista para los productos PS-12, PS-18 y PS-20, cuando actuaron solos (+VEH), llegando incluso a superar el máximo efecto de estimulación observado para el E2. Otros productos como PS-7, PS-13, PS-14 o PS-32 presentaron una notable actividad agonista cuando actuaron solos (+VEH), si bien sus valores de eficacia máxima (36–54 %) fueron inferiores a los del E2 (**Tabla 35**). El tratamiento simultáneo de algunos productos con E2 permitió la detección de fenómenos de superagonismo, alcanzándose un efecto de estimulación entre 2 y 9 veces más elevado al del agonista estrogénico. Esto se observó para PS-32 (E<sub>max</sub> = 900 %), PS-28 (E<sub>max</sub> = 389 %), PS-34 (E<sub>max</sub> = 329 %), PS-38 (E<sub>max</sub> = 276 %), PS-27 (E<sub>max</sub> = 205 %), PS-12 (E<sub>max</sub> = 202 %); y en menor grado para PS-7 (E<sub>max</sub> = 166 %) y PS-14 (E<sub>max</sub> = 158 %) (**Tabla 35**). El superagonismo puede producirse a dosis altas, debido a eventos inespecíficos y es frecuente encontrarlo en agonistas/antagonistas parciales, como, por

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

ejemplo, el PS-13, cuya eficacia alcanzó el 36,64 % (+VEH), mientras que en presencia de E2, se redujo hasta el 61,13 % (Tabla 35). Entre los compuestos PSx también se encontraron productos con características antiestrogénicas (PS-9, PS-10, PS-13, PS-21, PS-30, PS-36, PS-39, PS-40 y PS-41), que no presentaron efectos agonistas por sí solos (+VEH), pero que, sin embargo, redujeron la Emax del E2 en un 50–67 % en combinación con éste (+E2) (Tabla 35).

**Tabla 35. Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PSx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/Emax (%)		E/Emax (%)	
	M	SEM	M	SEM
E2	100,00	11,29	nd	nd
ICI	-0,34	3,30	-3,54	3,22
4-OHT	-7,14	3,57	-10,62	0,64
PS-1	-8,10	3,63	97,56	12,09
PS-2	1,23	0,01	122,19	7,50
PS-3	-1,60	3,46	116,38	6,47
PS-4	12,21	0,78	189,66	18,88
PS-5	-6,42	2,12	137,08	4,98
PS-6	0,91	2,40	207,43	14,20
PS-7	53,39	0,46	166,96	7,57
PS-8	0,74	0,72	76,91	6,12
PS-9	-0,95	1,62	62,43	6,13
PS-10	4,74	0,19	61,33	0,47
PS-11	13,15	2,77	132,58	16,80
PS-12	183,01	1,44	202,95	9,31
PS-13	36,64	2,78	63,13	3,59
PS-14	54,08	12,96	158,04	5,83
PS-15	23,29	0,90	179,54	1,69
PS-16	0,23	0,26	102,53	12,67
PS-17	2,90	2,98	nd	nd
PS-18	115,10	6,09	96,46	9,10
PS-19	-3,30	1,30	102,78	6,45
PS-20	159,62	33,34	82,24	10,25
PS-21	5,80	5,43	43,54	13,44
PS-22	-2,16	0,71	130,67	5,93
PS-23	0,95	0,35	89,82	9,63
PS-24	-6,71	0,53	79,69	16,38
PS-25	-4,62	0,21	97,29	7,05
PS-26	nd	nd	106,88	6,47
PS-27	-16,18	1,05	205,43	11,66
PS-28	7,44	0,20	389,33	20,62
PS-29	17,20	0,57	159,57	3,29
PS-30	-18,21	1,40	55,16	1,69
PS-31	-2,21	0,24	364,76	9,73
PS-32	38,41	2,78	896,61	71,49
PS-33	-10,83	1,10	82,21	7,30

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 35 (continuación). Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PSx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/Emax (%)		E/Emax (%)	
	M	SEM	M	SEM
PS-34	-2,79	0,30	329,24	22,44
PS-35	8,43	0,36	140,90	18,99
PS-36	-13,52	1,19	60,58	8,86
PS-37	-4,88	3,11	136,06	4,40
PS-38	19,58	0,70	276,34	20,82
PS-39	-4,12	4,29	46,52	25,68
PS-40	-12,84	1,15	41,76	0,24
PS-41	8,83	8,42	33,79	17,42

Se presentan los resultados de los experimentos de gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Las células se sembraron en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) y se pretrataron durante 3 horas con ICI (10 nM), 4-OHT (1  $\mu$ M) o los compuestos PSx (10  $\mu$ M), previo a la adición de VEH o E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. En la tabla se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores medios (M) y error estándar de la media (SEM) del porcentaje de eficacia estrogénica (E/Emax %), calculados a partir de la máxima eficacia detectada con E2 (100 % del efecto).

Las determinaciones de las relaciones estructura-actividad revelaron que las moléculas con grupos metoxilo (PS-13) y grupos metilendioxi (PS-4, PS-7, PS-14, PS-15) tendían a comportarse como agonistas. Sin embargo, también pusieron de manifiesto que muchas de las moléculas con carácter antagonista (entre ellas PS-10, PS-21, PS-24, PS-41) presentaban una estructura tipo pirazoles hidroxilados (**Figura 32**).



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

En paralelo a los estudios de actividad transcripcional dependiente de ER $\alpha$  mediante ensayos de luciferasa, se investigó el potencial efecto de los compuestos PSx sobre la viabilidad de células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos durante 7 días y expuestas, posteriormente, a los PSx (10  $\mu$ M, 3 horas) o la combinación PSx + E2 (0,1 nM), prolongando el tratamiento durante 24 horas (Tabla 36).

**Tabla 36. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PSx determinada por MTT en células T47D-KBluc.**

ID	PSx + VEH				PSx + E2			
	S (%)		IC50 ( $\mu$ M)		S (%)		IC50 ( $\mu$ M)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
4-OHT	0,00	4,90	>10	nd	0,00	11,39	>10	nd
ICI	0,00	6,00	>10	nd	0,00	4,88	>10	nd
PS-1	0,00	8,99	>10	nd	57,64	1,39	>10	nd
PS-2	0,00	6,00	>10	nd	0,00	7,31	>10	nd
PS-3	0,00	6,00	>10	nd	19,46	2,44	>10	nd
PS-4	0,00	8,49	>10	nd	7,14	6,62	>10	nd
PS-5	0,00	5,00	>10	nd	11,33	6,97	>10	nd
PS-6	0,00	3,00	>10	nd	20,44	3,83	>10	nd
PS-7	0,00	5,50	>10	nd	20,69	4,18	>10	nd
PS-8	9,57	6,99	>10	nd	38,92	5,57	>10	nd
PS-9	18,40	9,49	>10	nd	40,89	0,70	>10	nd
PS-10	0,00	2,50	>10	nd	18,97	0,35	>10	nd
PS-11	11,68	9,49	>10	nd	38,92	1,39	>10	nd
PS-12	5,68	11,99	>10	nd	36,95	6,97	>10	nd
PS-13	0,00	5,21	>10	nd	11,08	1,74	>10	nd
PS-14	0,00	3,37	>10	nd	4,43	2,09	>10	nd
PS-15	0,00	0,00	>10	nd	17,73	2,79	>10	nd
PS-16	0,00	3,68	>10	nd	8,87	0,00	>10	nd
PS-17	53,72	6,99	>10	nd	60,59	1,39	>10	nd
PS-18	0,00	11,49	>10	nd	0,00	6,62	>10	nd
PS-19	0,00	14,99	>10	nd	2,71	2,44	>10	nd
PS-20	0,00	1,50	>10	nd	19,46	7,31	>10	nd
PS-21	39,59	5,50	>10	nd	53,94	0,35	>10	nd
PS-22	0,00	16,49	>10	nd	19,21	2,09	>10	nd
PS-23	20,16	14,49	>10	nd	45,32	0,70	>10	nd
PS-24	19,81	6,00	>10	nd	54,43	3,83	>10	nd
PS-25	0,00	0,61	>10	nd	5,78	0,50	>10	nd
PS-26	0,00	6,44	>10	nd	0,00	5,45	>10	nd
PS-27	0,00	5,21	>10	nd	0,00	9,91	>10	nd
PS-28	1,38	0,92	>10	nd	22,42	7,18	>10	nd
PS-29	0,00	0,00	>10	nd	20,32	4,21	>10	nd
PS-30	0,00	0,61	>10	nd	0,00	1,49	>10	nd
PS-31	0,00	3,07	>10	nd	0,00	6,44	>10	nd
PS-32	0,00	8,89	>10	nd	8,06	4,21	>10	nd
PS-33	0,00	2,15	>10	nd	0,00	7,18	>10	nd
PS-34	0,00	8,89	>10	nd	0,00	1,73	>10	nd
PS-35	0,00	7,05	>10	nd	0,00	6,44	>10	nd
PS-36	8,54	2,45	>10	nd	26,09	0,00	>10	nd
PS-37	0,00	5,21	>10	nd	23,12	5,70	>10	nd



**Tabla 36 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PSx determinada por MTT en células T47D-KBluc.**

ID	PSx + VEH				PSx + E2			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PS-38	5,29	7,66	>10	nd	16,29	12,88	>10	nd
PS-39	0,00	14,71	>10	nd	11,56	4,21	>10	nd
PS-40	0,00	6,13	>10	nd	0,18	0,99	>10	nd
PS-41	0,00	1,53	>10	nd	10,68	1,49	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (T47D-KBluc) crecidas y tratadas en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) durante 24 horas. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

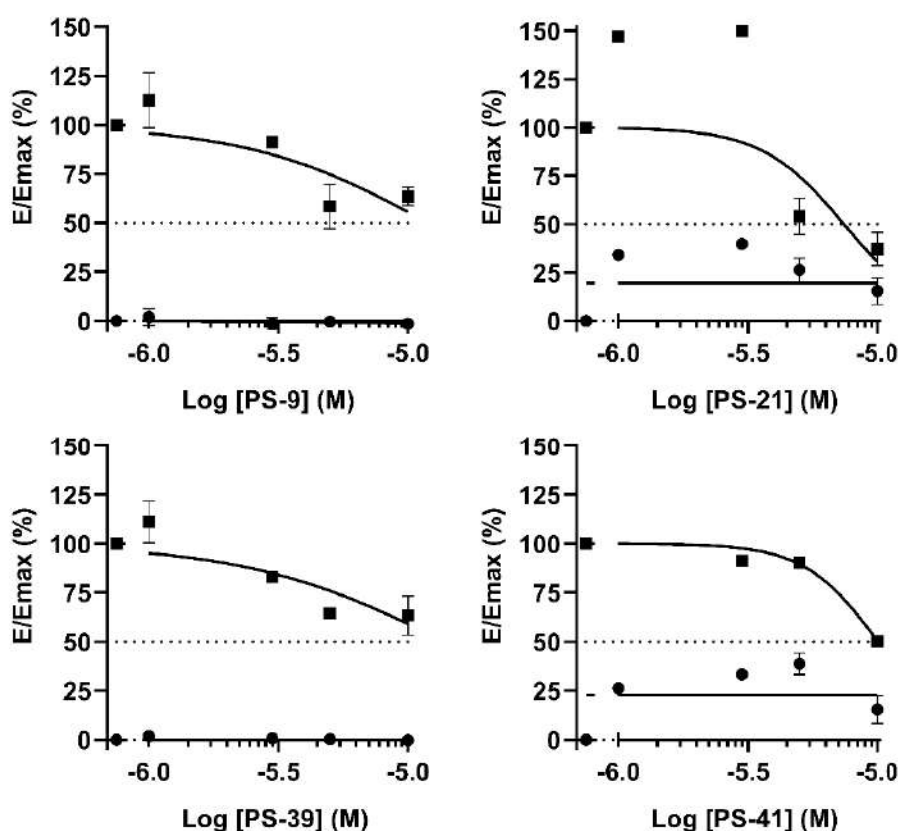
La mayor parte de los compuestos PSx no produjo una reducción significativa de la viabilidad celular cuando estos actuaron por sí solos (+VEH) tras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, entre todos los compuestos de esta serie química cabe destacar el notable efecto inhibitorio de los productos PS-17 (53,72 %) y PS-21 (39,59 %). La adición del E2 al medio de cultivo expuesto a los productos PS-17, PS-21, PS-23 y PS-24 incrementó el efecto inhibitorio de éstos sobre la viabilidad celular (entre un 45-60 %) (Tabla 36).

### 1.9.2. Compuestos líderes de la serie PSx

Tras analizar los resultados de los cribados TDD y PDD en la serie química de compuestos PSx, el grupo QUIBIONAT (IUBO, ULL) aportó datos relativos a los *Glide Score* obtenidos en estudios de *docking* molecular realizados sobre la estructura cristalizada del ERα, con valores entre -8,66 y -10,33 kcal/mol. La combinación de las tres variables permitió seleccionar 4 compuestos líderes de la quimioteca: PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41. Estos compuestos fueron estudiados en mayor profundidad mediante ensayos de luciferasa de dosis-respuesta y de tipo de antagonismo en células T47D-Kluc; y ensayos de luciferasa en células MDA-kb2 para evaluar su actividad moduladora de la transcripción dependiente de los receptores de andrógenos (AR) y glucocorticoides (GR). Adicionalmente, se caracterizó la afinidad de unión de los compuestos líderes por el ERα en experimentos de *binding* y se aportaron datos relativos a sus propiedades farmacocinéticas mediante su perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

1.9.2.1. Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta

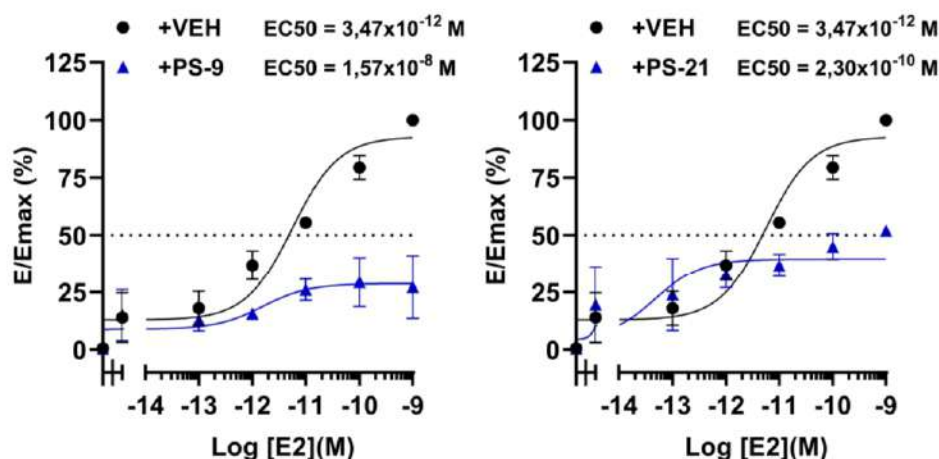
Teniendo en cuenta los resultados previos en los que se demostró la capacidad de los compuestos PSx líderes para modular la actividad transcripcional mediada por el ER $\alpha$ , se realizaron ensayos de luciferasa de dosis-respuesta, para investigar su comportamiento sobre células T47D-KBluc en ausencia (+VEH) o presencia de E2 (0,1 nM). El efecto antagonista se determinó por el grado de interferencia que los compuestos mostraron en su combinación con E2, posibilitando el cálculo de los valores de IC<sub>50</sub> para aquellos compuestos que redujeron la E<sub>max</sub> del E2 en más del 50 %. Estos ensayos revelaron valores de IC<sub>50</sub> de 1,19  $\mu$ M, 7,42  $\mu$ M, 13,82  $\mu$ M y 10,04  $\mu$ M para los productos PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41, respectivamente (**Figura 48**).



**Figura 48.** Curvas de dosis-respuesta de los PSx líderes ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc en ausencia o presencia de E2. Las células T47D-KBluc fueron sembradas en medio desprovisto de estrógenos (5% DCC-FBS) y pretratadas durante 3 horas con los compuestos PSx (1–10  $\mu$ M), previamente a la adición de VEH o de E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. Los compuestos ICI (10 nM) y 4-OHT (1  $\mu$ M) fueron empleados como controles de antagonismo. Se incluyeron las gráficas de cuatro compuestos PSx (PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41), representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/E<sub>max</sub> (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). Las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se representan como ● y las dosis de producto actuando en presencia de E2 (0,1 nM) se representan como ■.

1.9.2.2. Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo

Los PSx líderes de la quimioteca mostraron un comportamiento antagonista cuando se combinaron a sus dosis más altas (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) ensayadas con E2 (0,1 nM). Con el objetivo de seguir caracterizando su actividad antiestrogénica, se evaluó el tipo de antagonismo de los productos PS-9 y PS-21 sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  mediante ensayos de luciferasa (**Figura 49**). Para estos ensayos, las células T47D-KBluc fueron expuestas a concentraciones submaximales de E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) solas (+VEH) o en combinación de los PSx líderes a una dosis fija (5  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 49.** Efectos antiestrogénicos específicos de los compuestos PSx sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  medida en ensayos de luciferasa en células T47D-KBluc. Las gráficas incluyen las curvas de dosis-respuesta del E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) actuando solo (+VEH, representado por ●), frente a las dosis-respuesta del E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) en presencia de una dosis fija; (5  $\mu\text{M}$ ) de los compuestos PS-9 y PS-21 (representado por ▲). Para ello, se representan el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). En la figura se incluyen junto a la leyenda, los datos de potencia agonista (EC50) del E2 individualmente, respecto al mismo valor del E2 en presencia de la dosis fija de producto.

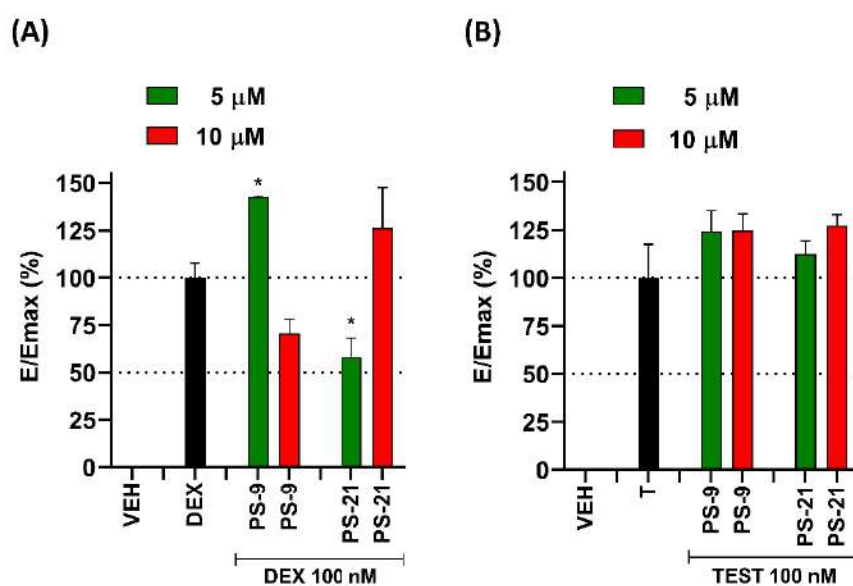
Los compuestos PS-9 y PS-21 redujeron considerablemente tanto la potencia (incremento de los valores de EC50) como la eficacia (disminución de los valores de E/Emax %) del E2, exhibiendo un comportamiento característico de antagonistas no competitivos, ya que el aumento de la dosis del agonista (E2) no fue capaz de revertir completamente el antagonismo. En concreto, PS-21 y PS-9 redujeron 100 y 10.000 veces, respectivamente, el efecto agonista del E2 (**Figura 49**).

1.9.2.3. Ensayos de luciferasa en células MDA-kb2

Puesto que existe un alto grado de homología en el dominio *Ligand Binding Domain* (LBD) de los receptores nucleares humanos para hormonas esteroideas, se estudió el potencial efecto modulador de los compuestos PSx líderes (PS-9 y PS-21) sobre la actividad transcripcional



dependiente del AR y el GR en células MDA-kb2, mediante ensayos de luciferasa. Los experimentos aportaron una medida de la selectividad de estos compuestos por el ER $\alpha$ . Las células MDA-kb2 fueron tratadas con los PS-9 y PS-21 a 5 y 10  $\mu$ M (solos, +VEH), y en combinación con testosterona (TEST) o dexametasona (DEX) a 100 nM. Ninguno de los compuestos mostró actividad agonista sobre AR y GR (datos no mostrados) ni efectos inhibitorios sobre la actividad luciferasa dependiente del AR. Sin embargo, PS-9 (10  $\mu$ M) y PS-21 (5  $\mu$ M) se comportaron como antagonistas parciales con respecto al GR, reduciendo la Emax de la DEX en un 25–30 % (Figura 50).



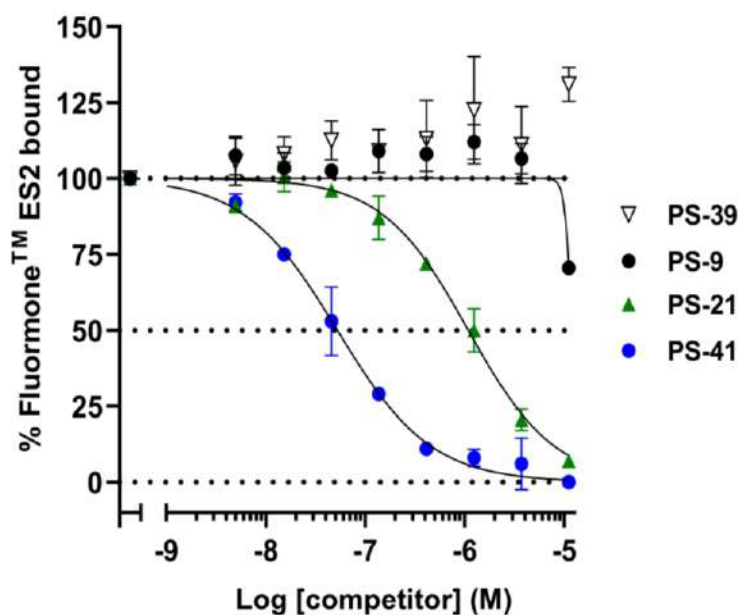
**Figura 50.** Efectos de los pirazoles PS-9 y PS-21 sobre la transcripción dependiente de AR y GR en células MDA-kb2 medida en ensayos de luciferasa. Se representan la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con (A) dexametasona (DEX, 100 nM), el ligando del GR y (B) testosterona (TEST, 100 nM), el ligando del AR. Las barras correspondientes a las dosis de PSx a 5  $\mu$ M se representaron en color verde y las correspondientes a las dosis de 10  $\mu$ M en color rojo. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada condición de tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p$  < 0.05, con respecto a DEX o TEST.

#### 1.9.2.4. Ensayos de unión o *binding* al ER $\alpha$

Puesto que los PSx líderes modularon la actividad transcripcional dependiente del ER $\alpha$ , se investigó si este efecto era resultado de una interacción física con el receptor. Para ello, los compuestos fueron evaluados por su afinidad de unión al ER $\alpha$  recombinante humano (rhER $\alpha$ ) mediante el kit LanthaScreen® TR-FRET RE $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific, EEUU), en el que un mayor desplazamiento del ligando Fluormone<sup>TM</sup> ES2 del ER $\alpha$  implica un impedimento o reducción de su capacidad de unión al receptor y su ocupación por los compuestos de interés en función de su afinidad de unión. En estos ensayos se utilizaron diez valores de concentración (0,005–11,1  $\mu$ M) de cada producto líder y los resultados obtenidos se compararon con los observados para el 4-OHT (1,52 x 10<sup>-5</sup> – 0,1  $\mu$ M), a partir de las curvas dosis-efecto obtenidas.



Los resultados mostraron que los compuestos PS-9 y PS-39 produjeron un desplazamiento de la Fluormone™ ES2 del rhER $\alpha$  inferior al 50 % a todas las dosis ensayadas ( $IC_{50} > 11,1 \mu M$ ) (**Figura 51**). Los productos PS-21 y PS-41 produjeron un desplazamiento del ligando por encima del 50 % con valores de  $IC_{50}$  de  $1,09 \mu M$  y  $5,23 \mu M$ , respectivamente (**Figura 51**). Por su parte, el 4-OHT desplazó completamente el ligando del rhER $\alpha$ , estimándose un valor de  $IC_{50}$  por debajo de la mínima dosis ensayada ( $IC_{50} = 3,9 \times 10^{-6} \mu M$ ) (datos no mostrados).



**Figura 51.** Estudio dosis-efecto de la afinidad de unión de los PSx líderes al rhER $\alpha$  por desplazamiento del ligando Fluormone™ ES2. Cuantificación del porcentaje de ligando (Fluormone™ ES2) unido al rhER $\alpha$  tras la competición a diferentes dosis ( $0,005 \mu M - 11,1 \mu M$ ) de los compuestos PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41.

Los resultados de afinidad por el rhER $\alpha$  obtenidos para los compuestos (PS-41 y PS-21) se correlacionaron perfectamente con los datos *in silico* obtenidos, en los que se apuntaba que la presencia de grupos hidroxilo en la estructura de los pirazoles favorecía su interacción con el ER $\alpha$  (datos no mostrados).

#### 1.9.2.5. Perfil ADME

Finalmente, se realizó un estudio del perfil ADME (QUIBIONAT) de los productos de la serie PSx (PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41) que mostraron las características más interesantes de actividad biológica y de modelización por *docking*, con el objetivo de predecir algunas de sus características farmacocinéticas. Los descriptores físicoquímicos calculados con el programa QikProp, aplicando las reglas de Lipinski (198,199), se presentan en la **Tabla 37**.

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 37. Parámetros farmacocinéticos computacionales del estudio ADME predictivo de los compuestos PS-9, PS-21, PS-39 y PS-41.

Propiedades	Valores recomendados	ID Compuestos evaluados			
		PS-9	PS-21	PS-39	PS-41
CNS	-2 (inactivo) a +2 (activo)	0	0	0	-1
QPlogBB	-3,0 a +1,2	-0,40	-0,50	-0,40	-0,90
QPPCaCo2	<25 deficiente >500 eficiente	1723	765	1756	523
QPPMDCK	<25 deficiente >500 eficiente	891	983	909	245
QPlogKhsa	-1,5 a +1,5	1,00	1,00	1,00	0,90
QPlogPo/w	-2,0 a +6,5	5,30	5,00	5,40	4,50
QPlogKp	-8,0 a +1,0	-1,10	-1,90	-1,30	-2,00
QPlogS	-6,5 a +0,5	-7,70	-6,70	-8,0	-7,30
#metab	1 a 8	1	2	4	1
%HOA	>80 % alta <25 % baja	100,00	94,90	100,00	100,00
HOA	1 (bajo), 2 (medio) o 3 (alto)	3	3	3	3
PSA	7 a 200	48,40	59,30	55,60	62,60
SASA	300 a 1000	659,6	637,50	706,90	634,00
mol MW	130 a 725	351,4	407,30	383,4	337,40
#rotor	0 a 15	2	2	3	2
donorHB	0 a 6	0	2	0	1
acceptHB	2 a 20	3,20	2,50	4,00	3,20

En la tabla se incluyen las siguientes variables de estudio: CNS (predicción de la actividad en el sistema nervioso central (SNC) en una escala de -2 (inactivo) a +2 (activo)), QPlogBB (predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre), QPPCaCo2 (predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en nm/s), QPPMDCK (predicción de la permeabilidad en la línea de riñón canina Madin-Darby en nm/s), QPlogKhsa (predicción de la unión a la albúmina humana sérica), QPlogPo/w (predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua), QPlogKp (predicción de la permeabilidad en la piel), QPlogS (predicción de la solubilidad acuosa), #metab (número de reacciones metabólicas probables), % HOA (predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%), HOA (predicción cualitativa de la absorción oral humana), PSA (área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de carbonilos), SASA (superficie total accesible al disolvente), MW (peso molecular), #rotor (número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos), donorHB (número de donadores de enlace por puente de hidrógeno) y acceptHB (número de aceptores de enlace por puente de hidrógeno).

Todos los compuestos estudiados mostraron valores adecuados y dentro del rango óptimo de cada parámetro farmacocinético. Es destacable la predicción de baja actividad en el Sistema Nervioso Central (SNC) para todos estos compuestos, correlacionándose esta variable con el adecuado valor de coeficiente de partición cerebro/sangre (QPlogBB). Los cuatro productos PSx exhibieron buenos parámetros de permeabilidad celular, con una alta biodisponibilidad oral (HOA y % HOA) y valores adecuados para el coeficiente de reparto octanol/agua (QPlogPo/w) (Tabla 37).

## 1.10. Compuestos derivados de lignanos (LGx)

### 1.10.1. Cribado farmacológico mixto

La serie química de los compuestos derivados de lignanos (LGx) fue sometida a un cribado farmacológico mixto (PDD+TDD). En primer lugar, los productos LGx fueron evaluados fenotípicamente, determinando su potencial efecto sobre la viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento en dos líneas celulares de cáncer de mama ER+ (MCF-7 y T47D) crecidas en condiciones de medio completo (**Tabla 38**).

**Tabla 38. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos LGx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+.**

ID	MCF-7				T47D			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
<b>DOXO</b>	96,35	8,96	0,06	0,03	100,47	2,48	0,16	0,05
<b>4-OHT</b>	75,60	4,86	4,69	2,85	88,91	13,81	6,06	0,36
<b>ICI</b>	80,73	6,52	0,04	0,04	73,43	7,39	16,37	12,20
<b>LG-1</b>	12,73	18,01	>10	nd	22,61	0,72	>10	nd
<b>LG-2</b>	25,97	11,95	>10	nd	21,58	15,31	>10	nd
<b>LG-3</b>	25,40	14,67	>10	nd	28,06	11,71	>10	nd
<b>LG-4</b>	14,20	15,07	>10	nd	24,51	14,86	>10	nd
<b>LG-5</b>	15,19	21,49	>10	nd	12,81	9,19	>10	nd
<b>LG-6</b>	26,09	36,90	>10	nd	17,90	2,46	>10	nd
<b>LG-7</b>	29,62	6,90	>10	nd	18,12	12,69	>10	nd
<b>LG-8</b>	29,30	2,22	>10	nd	12,81	12,63	>10	nd
<b>LG-9</b>	15,08	1,22	>10	nd	12,22	11,54	>10	nd
<b>LG-10</b>	33,34	15,71	>10	nd	16,57	14,50	>10	nd
<b>LG-11</b>	33,33	15,37	>10	nd	16,73	6,76	>10	nd
<b>LG-12</b>	22,98	17,44	>10	nd	18,12	13,00	>10	nd
<b>LG-13</b>	22,46	8,12	>10	nd	15,74	12,97	>10	nd
<b>LG-14</b>	27,15	17,33	>10	nd	27,52	1,34	>10	nd
<b>LG-15</b>	21,70	5,38	>10	nd	20,98	10,84	>10	nd
<b>LG-16</b>	16,52	2,71	>10	nd	9,75	7,60	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7 y T47D) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Se emplearon como controles positivos de inhibición de la viabilidad los compuestos DOXO, 4-OHT e ICI. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

En general, los compuestos de esta serie produjeron una inhibición de la viabilidad celular inferior al 35 % en ambas líneas celulares estudiadas (**Tabla 38**). Entre ellos, los compuestos LG-7, LG-8, LG-10 y LG-11 se mostraron como los más potentes en las células MCF-7, mientras que LG-3, LG-4 y LG-14 lo fueron en las células T47D (**Tabla 38**).

En segundo lugar, la quimioteca de compuestos LGx fue sometida a un cribado TDD (basado en la diana del ER $\alpha$ , en células T47D-KBluc mediante ensayo de gen reportero de luciferasa), lo que permitió identificar compuestos con capacidad de modular la actividad transcripcional del ER $\alpha$ , a través de la detección de actividades estrogénicas, antiestrogénicas y mixtas (**Tabla 39**).

**Tabla 39. Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PSx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/Emax (%)		E/Emax (%)	
	M	SEM	M	SEM
E2	100,00	11,29	nd	nd
ICI	-0,34	3,30	-3,54	3,22
4-OHT	-7,14	3,57	-10,62	0,64
LG-1	-0,21	1,45	88,45	23,45
LG-2	-3,16	0,24	77,91	12,24
LG-3	-0,52	0,90	103,78	21,27
LG-4	4,12	3,00	101,23	11,73
LG-5	9,09	2,27	236,76	26,26
LG-6	8,39	1,93	321,08	6,17
LG-7	-2,49	0,88	35,81	7,02
LG-8	1,98	3,97	31,68	1,12
LG-9	-0,96	1,31	46,07	5,28
LG-10	3,54	2,29	71,47	9,21
LG-11	-0,78	1,55	49,26	4,09
LG-12	-2,40	7,49	41,49	14,96
LG-13	-13,68	0,80	23,77	8,40
LG-14	-19,27	1,32	104,96	23,48
LG-15	-4,71	3,93	91,75	10,27
LG-16	-19,66	1,27	25,19	5,60

Se presentan los resultados de los experimentos de gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Las células se sembraron en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) y se pretrataron durante 3 horas con ICI (10 nM), 4-OHT (1  $\mu$ M) o los compuestos LGx (10  $\mu$ M), previo a la adición de VEH o E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. En la tabla se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores medios (M) y error estándar de la media (SEM) del porcentaje de eficacia estrogénica (E/Emax %), calculados a partir de la máxima eficacia detectada con E2 (100 % del efecto).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Estos ensayos permitieron identificar a los productos LG-5 y LG-6 como agonistas parciales (actividad estrogénica del 8–9 %) cuando actuaron solos (+VEH), encontrando, además, un efecto de superagonismo cuando se combinaron con E2 (0,1 nM). Entre los compuestos LGx también se encontraron productos con características antiestrogénicas (LG-7, LG-8, LG-9, LG-11, LG-12, LG-13, LG-15 y LG-16), que no presentaron efectos por sí solos (+VEH), pero que, sin embargo, redujeron la Emax del E2 en un 50–70 % en combinación con éste (**Tabla 39**)

En paralelo a los estudios de actividad transcripcional, se exploró el efecto que los compuestos LGx presentaron sobre la viabilidad de células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos durante 7 días y expuestas, posteriormente, a los LGx (10 µM, 3 horas) o la combinación LGx + E2 (0,1 nM), prolongando el tratamiento durante 24 horas (**Tabla 40**).

**Tabla 40. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos LGx determinada por MTT en células T47D-KBluc.**

ID	LGx + VEH				LGx + E2			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
4-OHT	0,00	4,90	>10	nd	0,00	11,39	>10	nd
ICI	0,00	6,00	>10	nd	0,00	4,88	>10	nd
LG-1	8,15	8,99	>10	nd	35,71	12,19	>10	nd
LG-2	0,00	6,00	>10	nd	2,46	10,45	>10	nd
LG-3	0,00	6,00	>10	nd	3,94	1,39	>10	nd
LG-4	0,00	8,49	>10	nd	0,00	5,92	>10	nd
LG-5	0,00	5,00	>10	nd	0,49	1,39	>10	nd
LG-6	10,27	3,00	>10	nd	29,31	1,74	>10	nd
LG-7	11,33	5,50	>10	nd	24,38	2,44	>10	nd
LG-8	31,47	6,99	>10	nd	55,67	1,39	>10	nd
LG-9	20,52	9,49	>10	nd	39,41	13,24	>10	nd
LG-10	0,00	2,50	>10	nd	28,57	2,79	>10	nd
LG-11	11,33	9,49	>10	nd	34,98	5,57	>10	nd
LG-12	8,86	11,99	>10	nd	10,32	9,64	>10	nd
LG-13	0,00	5,21	>10	nd	0,00	3,47	>10	nd
LG-14	20,02	3,37	>10	nd	16,64	6,44	>10	nd
LG-15	21,11	0,00	>10	nd	18,91	3,72	>10	nd
LG-16	7,67	3,68	>10	nd	9,98	2,97	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (T47D-KBluc) crecidas y tratadas en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) durante 24 horas. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10 µM); y los valores de IC50 (µM) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10 µM. En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10 µM (>10) y la desviación estándar (SD) se muestra como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 (µM) se presentan como media (M) ± (SD).

La mayor parte de los compuestos no produjo una reducción significativa de la viabilidad celular cuando actuaron por sí solos (+VEH) tras 24 horas de tratamiento, a excepción del LG-8 (que inhibió la viabilidad celular en torno a un 30 %). En general, la adición de E2 al medio de cultivo que contenía los LGx incrementó el efecto inhibitorio de éstos sobre la viabilidad celular. Por ejemplo, la combinación del LG-8 con el E2 redujo la viabilidad celular hasta el 56 % (**Tabla 40**).

### 1.10.2. Compuestos líderes de la serie LGx

Tras analizar los resultados de los cribados TDD y PDD en la serie química de compuestos LGx, el grupo QUIBIONAT aportó datos relativos a los *Glide Score* obtenidos en estudios de *docking* molecular realizados sobre la estructura cristalizada del LBD del ER $\alpha$  (en conformación antagonista con el 4-OHT), con valores entre  $-8,95$  y  $-8,79$  kcal/mol. De acuerdo con estos resultados, se observó que todos los LGx compartían un modo de unión similar en el bolsillo de unión hidrofóbico del LBD del ER $\alpha$ . No obstante, las predicciones sobre las interacciones entre los diferentes LGx y ER $\alpha$  no fueron siempre igual de favorables. La presencia de grupos metoxilo en los anillos aromáticos de algunos LGx forma un obstáculo voluminoso, que dificulta una adecuada interacción con el ER $\alpha$ . La sustitución de los grupos metilendioxi y metoxilo en algunos LGx por grupos hidroxilo en el anillo B, permite el establecimiento de interacciones más eficientes con el ER $\alpha$  a través de puentes de hidrógeno. Estas interacciones son claves para explicar la actividad biológica de los compuestos. De hecho, las relaciones estructura-actividad corroboraron este planteamiento, al revelar que moléculas con dos grupos hidroxilo en el anillo B (como LG-8, LG-11 o LG-16) tienden a comportarse como antagonistas, coincidiendo a su vez con los buenos valores de *docking score* (144).

La combinación de los cribados con los datos de *docking* permitió seleccionar a los 4 compuestos líderes de la quimioteca: LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11. Estos compuestos fueron estudiados en mayor profundidad mediante ensayos de luciferasa de dosis-respuesta y de tipo de antagonismo en células T47D-KBluc; y ensayos de luciferasa en células MDA-kb2 para evaluar su actividad moduladora de la transcripción dependiente del AR y del GR. Adicionalmente, se caracterizó la afinidad de unión de los compuestos líderes por el ER $\alpha$  en experimentos de *binding* y se aportaron datos relativos a sus propiedades farmacocinéticas mediante su perfil ADME.

#### 1.10.2.1. Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta

Teniendo en cuenta los resultados previos en los que se demostró la capacidad de los compuestos LGx líderes para modular la actividad transcripcional mediada por el ER $\alpha$ , se realizaron ensayos de luciferasa de dosis-respuesta para investigar su comportamiento sobre células T47D-KBluc en ausencia o presencia de E2. El efecto antagonista se midió por el grado

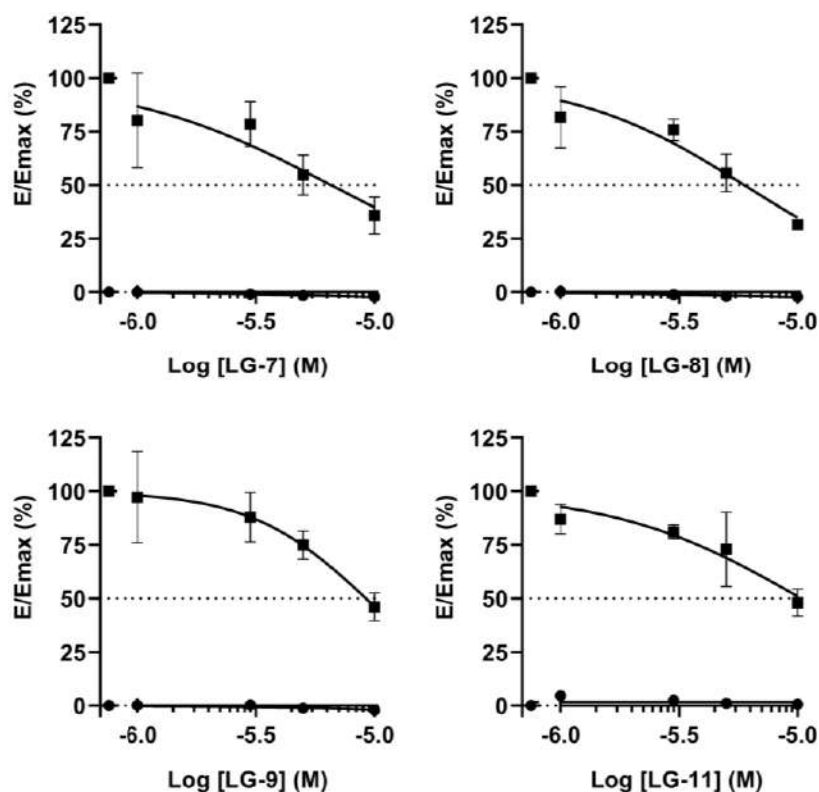
#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

de interferencia que los compuestos mostraron en su combinación con E2, posibilitando el cálculo de los valores de IC50 para aquellos compuestos que redujeron la Emax del E2 en más del 50 %. Los fármacos ICI y 4-OHT fueron empleados como controles de antagonismo (**Tabla 41**). Los productos LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11 presentaron valores de IC50 entre 5,94–10,3  $\mu\text{M}$  (**Tabla 41 y Figura 52**).

**Tabla 41. Valores de IC50 de los LGx ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc.**

ID	IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SEM
ICI	$1,90 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-5}$
4-OHT	0,02	0,007
LG-1	16,9	1,21
LG-2	>10	nd
LG-3	>10	nd
LG-4	>10	nd
LG-5	>10	nd
LG-6	>10	nd
LG-7	6,41	1,29
LG-8	5,94	1,17
LG-9	9,18	1,20
LG-10	>10	nd
LG-11	10,3	1,30
LG-12	>10	nd
LG-13	>10	nd
LG-14	>10	nd
LG-15	>10	nd
LG-16	>10	nd

Se presentan los resultados de los experimentos de dosis-respuesta del gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Las células se sembraron en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) y se pretrataron durante 3 horas con ICI, 4-OHT o los compuestos LGx, previo a la adición de VEH o E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. En la tabla se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores medios (M) y error estándar de la media (SEM) del valor de IC50, calculado mediante el análisis de regresión no lineal con el software GraphPad Prism (versión 8.4.3).

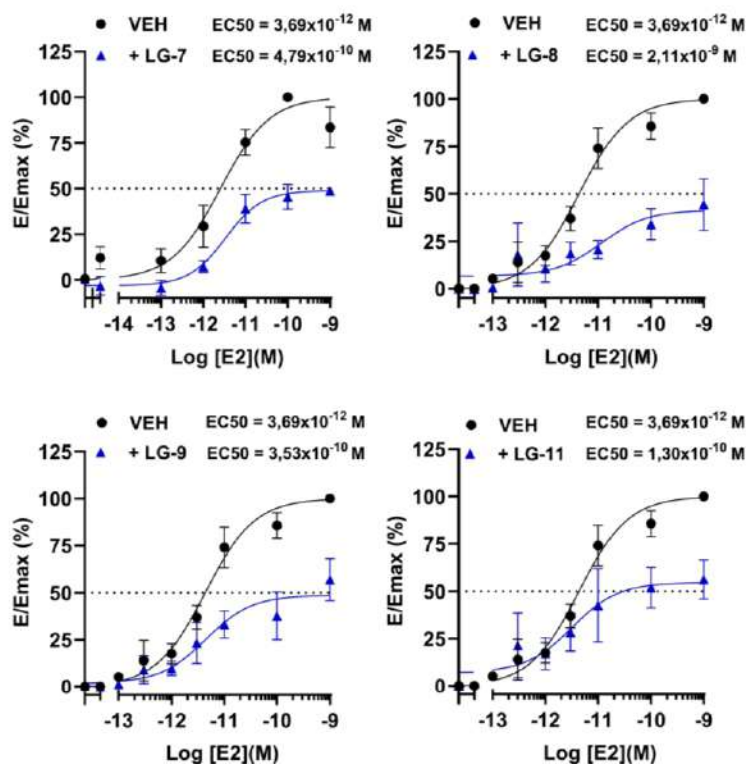


**Figura 52.** Curvas de dosis-respuesta de los LGx líderes ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc en ausencia o presencia de E2. Las células T47D-KBluc fueron sembradas en medio desprovisto de estrógenos (5% DCC-FBS) y pretratadas durante 3 horas con los compuestos LGx (1–10  $\mu$ M), previamente a la adición de VEH o de E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. Se incluyeron las gráficas de cuatro compuestos LGx (LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11), representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). Las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se representan como  $\bullet$  y las dosis de producto actuando en presencia de E2 (0,1 nM) se representan como  $\blacksquare$ .

#### 1.10.2.2. Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo

Los LGx líderes mostraron un comportamiento antagonista cuando fueron combinados a dosis altas (5 y 10  $\mu$ M) con E2 (0,1 nM). Con el objetivo de seguir caracterizando su actividad antiestrogénica, se evaluó el tipo de antagonismo de dichos productos sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  mediante ensayos de luciferasa. Para estos ensayos, las células T47D-KBluc fueron expuestas a concentraciones submaximales de E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) solas (+VEH) o en combinación de los LGx líderes a una dosis fija (5  $\mu$ M) (**Figura 53**). Los compuestos LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11 redujeron significativamente tanto la potencia (incremento de los valores de EC50) como la eficacia (disminución de los valores de E/Emax %) del E2, exhibiendo un comportamiento característico de antagonistas no competitivos, ya que el aumento de la dosis del agonista (E2) no fue capaz de revertir completamente el antagonismo. En concreto, LG-7, LG-9 y LG-11 redujeron el efecto agonista del E2 unas 100 veces mientras que el LG-8 lo hizo en unas 1000 veces, lo que disminuyó la eficacia del E2 por debajo del 50 % (**Figura 53**).



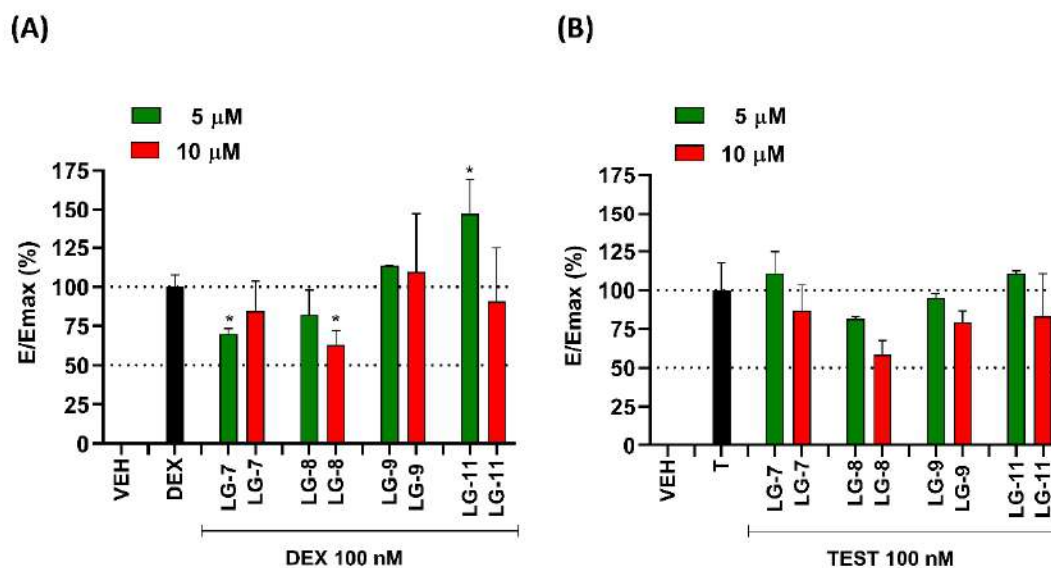


**Figura 53.** Efectos antiestrogénicos específicos de los compuestos LGx sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  medida en ensayos de luciferasa en células T47D-KBluc. Las gráficas incluyen las curvas de dosis-respuesta del E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) actuando solo (+VEH, representado por ●), frente a las dosis-respuesta del E2 ( $10^{-14}$  –  $10^{-9}$  M) en presencia de una dosis fija; (5  $\mu$ M) de los compuestos LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11 (representados por ▲). Para ello, se representan el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). En la figura se incluyen junto a la leyenda, los datos de potencia agonista (EC50) del E2 individualmente, respecto al mismo valor del E2 en presencia de la dosis fija de producto.

#### 1.10.2.3. Ensayos de luciferasa en células MDA-kb2

Al igual que con la serie química anterior, se estudió el potencial efecto modulador de los compuestos LGx líderes sobre la actividad transcripcional dependiente del AR o GR, en células MDA-kb2, mediante ensayos de luciferasa, como una medida de la selectividad de estos compuestos por el ER $\alpha$ . Las células MDA-kb2 fueron tratadas con los LGx a 5 y 10  $\mu$ M (solos, +VEH), y en combinación con DEX o TEST a 100 nM (**Figura 54**).

Ninguno de los compuestos mostró actividad agonista sobre AR y GR (datos no mostrados). Los compuestos LG-9 y LG-11 no tuvieron efectos inhibitorios sobre la actividad luciferasa dependiente del AR ni de GR. El compuesto LG-7 (5  $\mu$ M) mostró cierta actividad antagonista sobre el GR, reduciendo su Emax en un 25 % cuando actuó en combinación con DEX (**Figura 54A**); y no presentó efectos sobre la actividad transcripcional del AR (**Figura 54B**). Por otro lado, el LG-8 (10  $\mu$ M) mostró actividad antagonista sobre ambos receptores (**Figura 54**), pero sus efectos fueron estadísticamente significativos sobre el GR, reduciendo la Emax en un 25-30 %, en su combinación con DEX (**Figura 54A**).

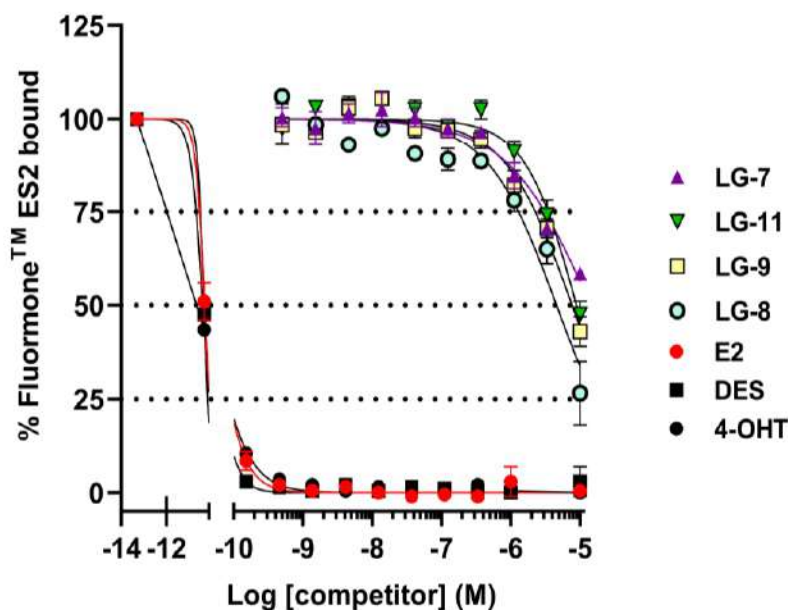


**Figura 54.** Efectos de los LGx líderes sobre la transcripción dependiente de AR y GR en células MDA-kb2 medida en ensayos de luciferasa. Se representan la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con (A) dexametasona (DEX, 100 nM), el ligando del GR y (B) testosterona (TEST, 100 nM), el ligando del AR. Las barras correspondientes a las dosis de LGx a 5 µM se representaron en color verde y las correspondientes a las dosis de 10 µM en color rojo. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada condición de tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ , con respecto a DEX o TEST.

#### 1.10.2.4. Ensayos de unión o *binding* al ER $\alpha$

Puesto que los LGx líderes modulan la actividad transcripcional dependiente del ER $\alpha$ , se investigó si este efecto era resultado de una interacción física con el receptor. Para ello, los compuestos fueron evaluados por su afinidad de unión al rhER $\alpha$  mediante el kit LanthaScreen® TR-FRET RE $\alpha$ . En estos ensayos se utilizaron diez valores de concentración ( $5 \times 10^{-4}$  – 10 µM) de cada producto líder y los resultados obtenidos se compararon con los observados para E2, dietilestilbestrol (DES) y 4-OHT ( $5 \times 10^{-5}$  – 1 µM) a partir de las curvas dosis-efecto obtenidas. Un mayor desplazamiento del ligando Fluormone™ ES2 del ER $\alpha$  implica un impedimento o reducción de su capacidad de unión al receptor y su ocupación por los compuestos de interés en función de su afinidad de unión.

Los resultados mostraron que los tres controles (DES, E2 y 4-OHT) desplazaron completamente el ligando Fluormone™ ES2 del rhER $\alpha$ , estimándose valores de IC<sub>50</sub> de  $3,2 \times 10^{-5}$  µM,  $5 \times 10^{-5}$  µM y  $4,2 \times 10^{-5}$  µM, respectivamente. El compuesto LG-7 generó un desplazamiento del ligando con un valor de IC<sub>50</sub> de 14,2 µM. Los derivados LG-8, LG-9 y LG-11 desplazaron más del 50 % del ligando nativo a la dosis más alta utilizada (10 µM), con valores de IC<sub>50</sub> de 4,56 µM, 7,67 µM y 8,9 µM, respectivamente (**Figura 55**).



**Figura 55.** Estudio dosis-efecto de la afinidad de unión de los LGx líderes al rhER $\alpha$  por desplazamiento del ligando Fluormone™ ES2. Cuantificación del porcentaje de ligando (Fluormone™ ES2) unido al rhER $\alpha$  tras la competición a diferentes dosis de los compuestos LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11 ( $5 \times 10^{-4}$  –  $10 \mu\text{M}$ ) o los controles 4-OHT, DES y E2 ( $5 \times 10^{-5}$  –  $1 \mu\text{M}$ ).

#### 1.10.2.5. Perfil ADME

Finalmente, se realizó un estudio del perfil ADME (QUIBIONAT) de los productos de la serie LGx que mostraron las características de actividad biológica más interesantes (LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11), con el objetivo de predecir algunas de sus propiedades farmacocinéticas. Los resultados de los descriptores fisicoquímicos se presentan en la **Tabla 42**. Todos los compuestos estudiados mostraron valores adecuados y dentro del rango óptimo de cada parámetro farmacocinético, excepto la solubilidad acuosa (QPlogS) que se salió de rango para el compuesto LG-9. Las predicciones de una alta absorción (%HOA y HOA) se confirmaron por el respeto a todas las reglas de Lipinski (198,199) y también por los altos valores obtenidos para los parámetros de permeabilidad, como, por ejemplo, QPPMDCK y QPPCaCo2, usados como modelos de las barreras hematoencefálica e intestino-sangre, respectivamente (**Tabla 42**).

Los principales resultados de la evaluación farmacológica preclínica de los LGx se incluyeron en la siguiente publicación: López-Rojas P, Amesty A, Guerra-Rodríguez M, Brito-Casillas Y, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. Pharmaceuticals. 2022. doi:10.3390/ph15050585 (ver Anexo II).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 42. Parámetros farmacocinéticos computacionales del estudio ADME predictivo de los compuestos LG-7, LG-8, LG-9 y LG-11.**

Propiedades	Valores recomendados	ID Compuestos evaluados			
		LG-7	LG-8	LG-9	LG-11
CNS	-2 (inactivo) a +2 (activo)	-1	-2	0	-1
QPlogBB	-3,0 a +1,2	-0,88	-1,16	-0,34	-0,82
QPPCaCo2	<25 deficiente >500 eficiente	1560,41	9906,04	9906,04	1104,89
QPPMDCK	<25 deficiente >500 eficiente	800,24	5899,29	5899,29	551,02
QPlogKhsa	-1,5 a +1,5	0,03	0,23	0,74	0,28
QPlogPo/w	-2,0 a +6,5	3,33	3,15	4,31	3,46
QPlogKp	-8,0 a +1,0	-1,37	-0,31	-0,19	-2,02
QPlogS	-6,5 a +0,5	-3,56	-4,98	-6,78	-4,00
#metab	1 a 8	6	5	4	7
%HOA	>80 % alta <25 % baja	100	100	100	100
HOA	1 (bajo), 2 (medio) o 3 (alto)	3	3	3	3
PSA	7 a 200	78,99	45,67	35,73	69,22
SASA	300 a 1000	624,64	579,37	602,78	592,77
mol MW	130 a 725	374,43	356,42	342,434	344,41
#rotor	0 a 15	11	6	7	8
donorHB	0 a 6	2	0	0	2
acceptHB	2 a 20	6,4	4,7	3,0	4,7

En la tabla se incluyen las siguientes variables de estudio: CNS (predicción de la actividad en el sistema nervioso central (SNC) en una escala de -2 (inactivo) a +2 (activo)), QPlogBB (predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre), QPPCaCo2 (predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en mm/s), QPPMDCK (predicción de la permeabilidad en la línea de riñón canina Madin-Darby en nm/s), QPlogKhsa (predicción de la unión a la albúmina humana sérica), QPlogPo/w (predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua), QPlogKp (predicción de la permeabilidad en la piel), QPlogS (predicción de la solubilidad acuosa), #metab (número de reacciones metabólicas probables), % HOA (predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%), HOA (predicción cualitativa de la absorción oral humana), PSA (área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de carbonilos), SASA (superficie total accesible al disolvente), MW (peso molecular), #rotor (número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos), donorHB (número de donadores de enlace por puente de hidrógeno) y acceptHB (número de aceptores de enlace por puente de hidrógeno).

#### 1.11. Pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx)

La quimioteca de compuestos tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLRx) fue diseñada y sintetizada (QUIBIONAT) para la identificación de compuestos con potencial para modular las respuestas celulares mediadas por los ER. Para ello, los PLRx fueron sometidos a un cribado farmacológico mixto (PDD y TDD), así como a un cribado virtual para valorar el grado de interacción de los PLRx con el ER $\alpha$  humano mediante *docking* molecular (217). La información combinada de estas variables permitió una primera selección de productos con actividades biológicas interesantes (PLRx líderes). Finalmente, los resultados obtenidos en sucesivos ensayos de actividad biológica permitieron la identificación de dos compuestos líderes



finales (PLR-56 y PLR-67), para los que se profundizó en su mecanismo de acción molecular y cuyos resultados se presentan en el Capítulo II de Resultados de la presente Tesis Doctoral.

### 1.11.1. Cribado farmacológico mixto: PDD y TDD

#### 1.11.1.1. Cribado farmacológico PDD

En primer lugar, los PLRx fueron evaluados fenotípicamente, determinando su potencial efecto sobre la viabilidad celular en ensayos de MTT tras 72 horas de tratamiento en líneas celulares de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) crecidas en condiciones de medio completo. Los resultados revelaron la existencia de 6 y 8 productos con valores de IC50 inferiores a 10  $\mu\text{M}$  en células de cáncer de mama SK-BR-3 y MCF-7, respectivamente. Los fármacos DOXO (IC50 = 0,04–0,07  $\mu\text{M}$ ), 4-OHT (IC50 = 4,4–7,85  $\mu\text{M}$ ) e ICI (IC50 = 0,5–50  $\mu\text{M}$ ) se emplearon como controles de actividad antitumoral, mostrando diferente actividad inhibitoria de la viabilidad celular, en función de la línea celular de estudio (**Tabla 43**).

**Tabla 43. Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PLRx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
DOXO	96,35	8,96	0,07	0,03	109,79	3,31	0,04	0,01
4-OHT	75,60	4,86	4,43	2,53	107,62	4,65	7,85	2,76
ICI	80,73	6,52	0,52	0,39	48,66	8,01	>50	0,00
PLR-1	45,72	7,02	>10	nd	20,99	3,49	>10	nd
PLR-2	0,00	5,29	>10	nd	0,00	4,30	>10	nd
PLR-3	12,53	3,40	>10	nd	11,73	5,45	>10	nd
PLR-4	6,24	6,68	>10	nd	0,00	1,80	>10	nd
PLR-5	16,88	2,34	>10	nd	0,00	6,00	>10	nd
PLR-6	0,00	14,82	>10	nd	0,00	9,75	>10	nd
PLR-7	4,88	3,87	>10	nd	0,00	5,90	>10	nd
PLR-8	0,00	5,55	>10	nd	14,34	2,37	>10	nd
PLR-9	13,87	12,46	>10	nd	13,39	3,24	>10	nd
PLR-10	6,82	1,87	>10	nd	16,98	5,26	>10	nd
PLR-11	10,74	5,90	>10	nd	9,59	7,95	>10	nd
PLR-12	57,82	2,85	>10	nd	36,05	3,42	>10	nd
PLR-13	6,26	2,68	>10	nd	21,45	5,71	>10	nd
PLR-14	37,24	12,12	>10	nd	39,47	4,32	>10	nd
PLR-15	20,29	1,56	>10	nd	17,93	8,06	>10	nd
PLR-16	22,58	5,28	>10	nd	18,62	2,28	>10	nd
PLR-17	2,92	5,98	>10	nd	4,87	5,66	>10	nd
PLR-18	2,07	3,53	>10	nd	0,00	9,28	>10	nd
PLR-19	18,88	5,68	>10	nd	17,19	7,68	>10	nd
PLR-20	19,78	5,89	>10	nd	4,37	9,78	>10	nd
PLR-21	18,37	2,77	>10	nd	15,82	5,77	>10	nd
PLR-22	0,00	5,25	>10	nd	0,00	7,52	>10	nd
PLR-23	26,38	8,13	>10	nd	10,40	8,05	>10	nd

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 43 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PLRx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 (µM)		S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PLR-24	41,00	6,05	>10	nd	19,45	4,04	>10	nd
PLR-25	10,79	1,45	>10	nd	0,75	8,14	>10	nd
PLR-26	57,28	4,99	>10	nd	28,39	11,05	>10	nd
PLR-27	68,06	6,05	8,83	1,65	50,49	1,97	>10	nd
PLR-28	38,01	11,53	>10	nd	56,79	5,81	>10	nd
PLR-29	24,71	8,22	>10	nd	8,68	4,63	>10	nd
PLR-30	35,15	7,06	>10	nd	38,61	4,11	>10	nd
PLR-31	0,00	12,65	>10	nd	0,00	4,65	>10	nd
PLR-32	35,85	3,42	>10	nd	33,30	6,31	>10	nd
PLR-33	21,63	5,97	>10	nd	28,81	7,08	>10	nd
PLR-34	0,00	4,57	>10	nd	8,19	2,37	>10	nd
PLR-35	0,00	15,83	>10	nd	5,42	6,25	>10	nd
PLR-36	4,37	6,27	>10	nd	15,17	10,63	>10	nd
PLR-37	23,44	11,63	>10	nd	2,94	6,71	>10	nd
PLR-38	0,00	8,55	>10	nd	11,64	5,67	>10	nd
PLR-39	38,23	6,23	>10	nd	83,62	20,18	4,89	0,07
PLR-40	39,99	9,85	>10	nd	39,49	5,71	>10	nd
PLR-41	78,24	2,42	6,54	0,58	108,39	6,50	2,16	0,06
PLR-42	73,43	4,84	>10	0,00	37,97	7,76	>10	nd
PLR-43	42,33	8,03	>10	nd	39,83	5,43	>10	nd
PLR-44	76,72	13,30	3,47	1,58	56,17	14,89	>10	nd
PLR-45	77,78	14,88	6,17	3,75	12,31	12,20	>10	nd
PLR-46	72,89	3,97	9,74	0,37	48,57	2,62	>10	nd
PLR-47	71,06	3,26	>10	0,00	82,77	6,16	2,73	0,06
PLR-48	47,50	2,89	>10	nd	27,64	2,23	>10	nd
PLR-49	35,70	2,28	>10	nd	36,95	4,28	>10	nd
PLR-50	57,33	5,97	>10	nd	10,47	4,32	>10	nd
PLR-51	49,82	9,26	>10	nd	11,07	6,72	>10	nd
PLR-52	40,53	8,97	>10	nd	0,00	3,03	>10	nd
PLR-53	39,44	4,91	>10	nd	35,50	4,15	>10	nd
PLR-54	43,61	4,20	>10	nd	34,62	3,84	>10	nd
PLR-55	39,58	5,66	>10	nd	38,92	2,77	>10	nd
PLR-56	79,78	7,28	2,54	1,30	85,58	6,11	1,51	0,12
PLR-57	38,34	7,93	>10	nd	22,22	7,71	>10	nd
PLR-58	13,86	6,76	>10	nd	5,18	5,08	>10	nd
PLR-59	39,03	8,47	>10	nd	40,66	4,71	>10	nd
PLR-60	71,63	0,85	>10	0,00	56,87	2,00	>10	nd
PLR-61	23,35	9,18	>10	nd	27,72	0,30	>10	nd
PLR-62	14,05	5,53	>10	nd	8,11	8,85	>10	nd
PLR-63	7,71	4,12	>10	nd	5,96	8,50	>10	nd
PLR-64	4,56	13,08	>10	nd	0,93	1,75	>10	nd
PLR-65	27,80	1,44	>10	nd	6,66	8,28	>10	nd
PLR-66	11,56	12,18	>10	nd	15,32	8,18	>10	nd
PLR-67	100,87	0,58	2,59	0,83	109,50	2,10	2,00	0,25

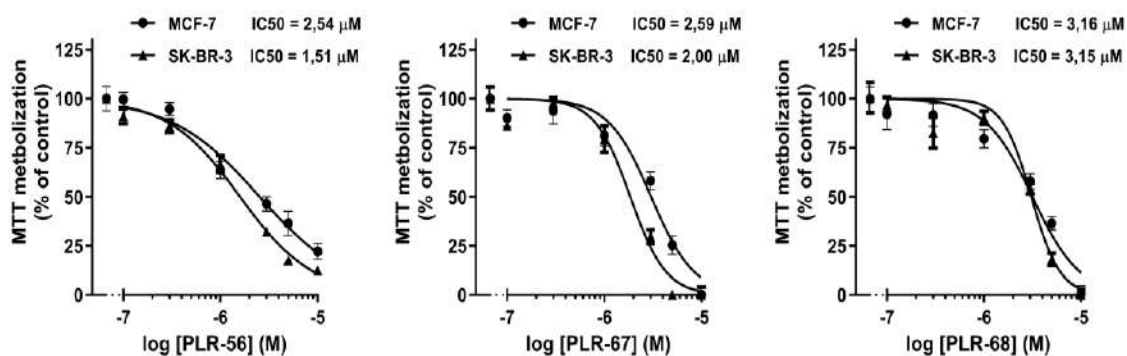


**Tabla 43 (continuación). Resultados de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PLRx determinada por MTT en células de cáncer de mama ER+ y HER2+.**

ID	MCF-7				SK-BR-3			
	S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )		S (%)		IC50 ( $\mu\text{M}$ )	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
PLR-68	100,03	4,06	3,16	0,06	107,61	6,70	3,15	0,00

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre células de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) tras 72 horas de tratamiento. Se incluye el nombre identificativo del compuesto (ID); de la línea celular; el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular, (S), calculado a partir de un cribado inicial con el tratamiento de los compuestos de esta serie a dosis fija (10  $\mu\text{M}$ ); y los valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) relativos a la dosis a partir de la que se logra una inhibición de la viabilidad celular del 50% de las células de estudio. Se emplearon como controles positivos de inhibición de la viabilidad los compuestos DOXO, 4-OHT e ICI. Los valores de IC50 se calcularon para aquellos compuestos que presentaron una inhibición de la viabilidad celular superior al 60 % en el tratamiento a 10  $\mu\text{M}$ . En caso contrario, aparece un valor de IC50 superior a 10  $\mu\text{M}$  (>10) y la desviación estándar (SD) se representa como no determinada (nd). Los datos de S (%) e IC50 ( $\mu\text{M}$ ) se presentan como media (M)  $\pm$  (SD).

El cribado PDD permitió identificar 3 compuestos (PLR-41, PLR-47 y PLR-39) que mostraron una cierta selectividad para las células HER2+ con respecto a las ER+ y otros 2 (PLR-44 y PLR-45) que manifestaron una notable actividad antitumoral en células ER+ (con valores de IC50 de 3,47 y 6,17  $\mu\text{M}$ , respectivamente), ausente en células HER2+ (IC50 >10  $\mu\text{M}$ ) (Tabla 43). Finalmente, se encontraron productos (PLR-56, PLR-67 y PLR-68) que exhibieron una actividad antitumoral similar en ambos linajes (con valores de IC50 entre 1,5 y 3,16  $\mu\text{M}$ ) (Figura 56).



**Figura 56. Gráficas dosis-efecto de los productos PLR-56, PLR-67 y PLR-68 en las líneas celulares MCF-7 y SK-BR-3.** Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con medio completo (10 % FBS). Se calculó un valor medio de IC50 para las dos estirpes tumorales a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes de células se representan como ● para MCF-7 y ▲ para SK-BR-3.

## 1.11.1.2. Cribado farmacológico TDD

En paralelo a los experimentos de viabilidad celular, la quimioteca de los PLRx fue sometida a un cribado TDD basado en la modulación transcripcional mediada por el ER $\alpha$ , a partir de ensayos de luciferasa en células T47D-KBluc crecidas en medio deprivado de estrógenos y expuestas, posteriormente, a los PLRx (10  $\mu$ M, con preincubación de 3 horas + VEH) o la combinación PLRx + E2 (0,1 nM), prolongando el tratamiento durante 16–24 h (**Tabla 44**). En general, los PLRx carecieron de actividad estrogénica (E/Emax < 10 %) cuando actuaron individualmente (+VEH), mientras que se mostraron como antagonistas con mayor o menor potencia (E/Emax (%) = 10–100 %) cuando se combinaron con E2 (0,1 nM). Sin embargo, los productos PLR-38 y PLR-39 fueron la excepción de esta serie, ya que se comportaron como agonistas en ausencia de E2 y desencadenaron un efecto superagonista en su presencia (**Tabla 44**). Los compuestos PLR-36 y PLR-37 se obtuvieron colateralmente en el proceso de síntesis de otras pirrolidonas y, puesto que no presentaban su misma estructura química, su evaluación biológica, dentro de esta quimioteca, no se estudió con mayor profundidad.

**Tabla 44. Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PLRx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/Emax (%)		E/Emax (%)	
	M	SEM	M	SEM
PLR-1	0,01	1,02	39,73	14,82
PLR-2	9,55	6,19	78,23	22,69
PLR-3	5,08	4,07	98,03	15,69
PLR-4	4,05	3,74	72,17	14,59
PLR-5	4,02	2,12	92,97	14,37
PLR-6	5,43	2,99	74,61	21,53
PLR-7	16,37	7,86	83,04	7,49
PLR-8	3,89	3,73	70,34	11,06
PLR-9	2,88	2,74	92,14	11,16
PLR-10	2,62	0,71	152,55	4,49
PLR-11	1,54	1,11	124,34	38,69
PLR-12	-1,43	1,53	119,51	23,29
PLR-13	0,73	0,49	116,88	25,55
PLR-14	3,21	2,92	48,33	5,02
PLR-15	0,29	0,22	94,13	22,70
PLR-16	0,56	0,41	101,29	19,36
PLR-17	1,82	0,74	89,34	28,74
PLR-18	3,39	0,85	97,73	12,10
PLR-19	1,90	1,18	106,91	16,33
PLR-20	4,31	2,33	86,77	3,79
PLR-21	2,00	0,28	78,62	17,76
PLR-22	1,74	0,20	110,61	18,25



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 44 (continuación). Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PLRx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/E <sub>max</sub> (%)		E/E <sub>max</sub> (%)	
	M	SEM	M	SEM
PLR-23	0,89	0,97	91,10	17,34
PLR-24	3,33	1,32	111,82	25,16
PLR-25	0,58	1,79	68,75	13,82
PLR-26	-0,29	1,67	77,75	27,24
PLR-27	0,60	0,02	157,73	21,47
PLR-28	1,32	3,15	77,59	28,28
PLR-29	1,92	1,68	84,76	27,11
PLR-30	0,11	2,78	49,70	26,07
PLR-31	24,41	8,32	91,30	23,26
PLR-32	0,10	0,10	93,79	3,74
PLR-33	8,17	5,67	97,54	13,53
PLR-34	0,80	1,54	69,98	2,09
PLR-35	8,40	2,47	73,15	21,21
PLR-36	0,93	0,05	146,44	26,55
PLR-37	2,99	1,25	133,55	9,44
PLR-38	27,15	9,21	156,90	17,47
PLR-39	76,55	32,67	255,57	7,61
PLR-40	-0,08	0,44	118,42	12,29
PLR-41	-1,01	2,56	172,56	28,04
PLR-42	-0,22	0,53	48,75	9,27
PLR-43	-0,18	0,55	12,10	0,42
PLR-44	3,08	4,84	89,30	9,17
PLR-45	-0,16	0,45	33,68	11,20
PLR-46	-0,26	0,53	18,78	3,01
PLR-47	-6,02	3,40	54,10	13,33
PLR-48	-0,04	0,23	111,66	11,14
PLR-49	-0,27	0,33	71,64	9,65
PLR-50	-0,67	0,92	126,11	21,36
PLR-51	-0,87	3,05	61,65	5,52
PLR-52	1,94	0,88	101,35	0,27
PLR-53	-3,22	1,32	31,89	11,43
PLR-54	-0,15	0,50	78,16	5,28
PLR-55	0,56	0,07	85,62	25,37
PLR-56	-0,32	0,73	105,29	18,23
PLR-57	-0,21	0,46	47,37	14,70
PLR-58	0,10	0,17	90,76	11,49
PLR-59	-0,11	0,59	47,66	7,85
PLR-60	0,47	0,68	75,73	2,10
PLR-61	0,11	0,26	134,13	37,57
PLR-62	0,69	0,39	71,08	0,21
PLR-63	0,12	0,36	129,70	14,97
PLR-64	0,90	0,07	98,68	1,33
PLR-65	-0,05	0,21	83,16	0,08
PLR-66	-0,13	0,21	115,39	15,81
PLR-67	-11,82	5,37	29,72	9,92

**Tabla 44 (continuación). Resultados de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  de los compuestos PLRx en células T47D-KBluc mediante ensayos de gen reportero de luciferasa.**

ID	VEH		E2	
	E/Emax (%)		E/Emax (%)	
	M	SEM	M	SEM
PLR-68	0,55	0,46	30,97	10,84

Se presentan los resultados de los experimentos de gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Las células se sembraron en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) y se pretrataron durante 3 horas con ICI (10 nM), 4-OHT (1  $\mu$ M) o los compuestos LGx (10  $\mu$ M), previo a la adición de VEH o E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. En la tabla se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores medios (M) y error estándar de la media (SEM) del porcentaje de eficacia estrogénica (E/Emax %), calculados a partir de la máxima eficacia detectada con E2 (100 % del efecto).

### 1.11.2. Ensayos de luciferasa de dosis-respuesta

El cribado farmacológico mixto de la serie PLRx permitió una primera selección de un tercio de los compuestos de esta quimioteca con actividad antiestrogénica, al modular la transcripción dependiente del ER $\alpha$  y reducir la Emax del E2 en, al menos, un 30% (Tabla 44). Teniendo en cuenta estos datos se realizaron ensayos de luciferasa de dosis-respuesta con estos PLRx para investigar su comportamiento sobre células T47D-KBluc en ausencia o presencia de E2 (0,1 nM). El efecto antagonista se midió por el grado de interferencia que los compuestos mostraron en su combinación con E2, posibilitando el cálculo de los valores de IC50 para aquellos compuestos que redujeron la Emax del E2 en más del 50 %, obteniéndose valores entre 3,4 y 10  $\mu$ M (Tabla 45).

**Tabla 45. Valores de IC50 de los PLRx ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc.**

ID	IC50 ( $\mu$ M)	
	M	SEM
ICI	$1,90 \times 10^{-4}$	$0,30 \times 10^{-4}$
4-OHT	0,02	0,007
PLR-1	3,40	1,64
PLR-5	>10	0,00
PLR-7	>10	0,00
PLR-8	>10	0,00
PLR-12	>10	0,00
PLR-18	>10	0,00
PLR-23	>10	0,00

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

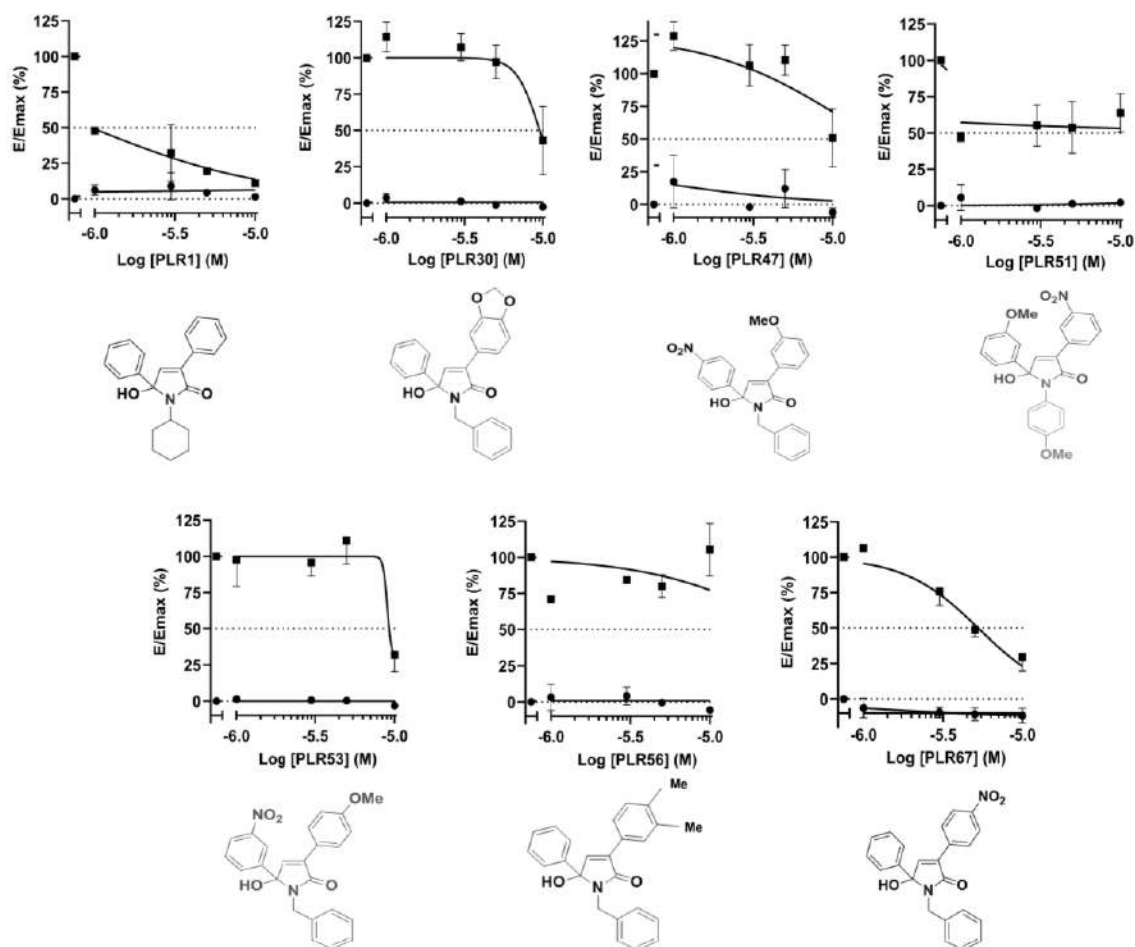
**Tabla 45 (continuación). Valores de IC50 de los PLRx ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc.**

ID	IC50 (μM)	
	M	SEM
PLR-24	>10	0,00
PLR-25	>10	0,00
PLR-26	>10	0,00
PLR-28	>10	0,00
PLR-30	8,35	1,35
PLR-33	>10	0,00
PLR-34	>10	0,00
PLR-41	>10	0,00
PLR-44	>10	0,00
PLR-47	6,54	3,47
PLR-50	>10	0,00
PLR-51	3,58	2,40
PLR-53	8,77	0,59
PLR-56	>10	0,00
PLR-67	8,20	1,19

Se presentan los resultados de los experimentos de dosis-respuesta del gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Las células se sembraron en medio libre de estrógenos (5% DCC-FBS) y se pretrataron durante 3 horas con ICI, 4-OHT o los compuestos PLRx, previo a la adición de VEH o E2 (0,1 nM) durante 16-24h. En la tabla se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores medios (M) y error estándar de la media (SEM) del valor de IC50, calculado mediante el análisis de regresión no lineal con el software GraphPad Prism (versión 8.4.3).

El efecto agonista del E2 fue inhibido mediante la coincubación con antiestrógenos como el ICI (IC50 =  $1,9 \times 10^{-4}$  μM) y 4-OHT (IC50 = 0,02 μM) (**Tabla 45**). Las curvas de dosis-efecto de los productos más potentes (PLR-1, PLR-30, PLR-47, PLR-51, PLR-53 y PLR-67) y la de otros sin actividad antiestrogénica aparente, como por ejemplo el PLR-56, se presentan en la **Figura 57**.

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I



**Figura 57.** Curvas de dosis-respuesta de diferentes PLRx ensayados en experimentos de luciferasa en células T47D-KBluc en ausencia o presencia de E2. Las células T47D-KBluc fueron sembradas en medio desprovisto de estrógenos (5% DCC-FBS) y pretratadas durante 3 horas con los compuestos PLRx (1-10  $\mu$ M), previamente a la adición de VEH o de E2 (0,1 nM) durante 16-24 horas. Se incluyen las gráficas de siete compuestos PLRx (PLR-1, PLR-30, PLR-47, PLR-51, PLR-53, PLR-56 y PLR-67), representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el E2 (100 % del efecto). Las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se representan como  $\bullet$  y las dosis de producto actuando en presencia de E2 (0,1 nM) se representan como  $\blacksquare$ . Debajo de la gráfica de cada PLRx se incluye su estructura química.

Las relaciones de estructura-actividad obtenidas indicaron que los compuestos con mayor efecto antiestrogénico presentaban, mayoritariamente, un grupo bencilo o ciclohexilo sobre el átomo de nitrógeno del anillo lactámico. El compuesto PLR-1, con un grupo hidroxilo sobre el heterociclo, presentó un potente efecto antagonista (**Figura 57**) con respecto a, por ejemplo, el PLR-31, cuyo efecto inhibitorio no fue significativo (**Tabla 44**), diferenciándose químicamente del primero en el reemplazo del grupo hidroxilo por un átomo de hidrógeno (**Figura 32**). El grupo hidroxilo posicionado en el heterociclo de la estructura química de los PLRx parecía influir, por tanto, en la actividad antiestrogénica de estos compuestos. Del mismo modo, la alquilación del grupo hidroxilo del PLR-1, que originó el compuesto PLR-33, al incorporar una cadena pirrolidinetoxi (**Figura 32**), produjo que este perdiera su actividad antiestrogénica, resultando en un producto inactivo (**Tablas 44 y 45**).



### 1.11.3. Estudio de *docking* molecular

Los estudios de *docking* molecular permitieron predecir virtualmente la afinidad de unión de los PLRx al LBD del ER $\alpha$  humano. Para ello, se compararon los resultados con los valores de *docking score* (*Glide score*) en conformación (*pose*) agonista para la genisteína (PDB 1X7R); y en conformación antagonista, previamente calculados para el raloxifeno (RAL, PDB 1ERR) y el 4-OHT (PDB 3ERT) unidos al LBD del ER $\alpha$ . A cada compuesto se le asignó un *Glide score* y se clasificaron en función de sus interacciones electrostáticas y alostéricas en el sitio de unión al ER $\alpha$ . Según los datos aportados por QUIBIONAT, la inspección visual de las diferentes *poses* permitió comprobar que los compuestos se situaban en el sitio activo del ER $\alpha$  en una ubicación y orientación similar a la de 4-OHT y RAL.

La *pose* conformacional antagonista del ER $\alpha$  con RAL (PDB 1ERR) otorgó resultados de *docking* más favorables que la *pose* conformacional del ER $\alpha$  con 4-OHT (3ERT) (Tabla 46). El RAL mostró el *docking score* de mayor afinidad por el ER $\alpha$  en la *pose* conformacional 1ERR (-14,18) y algunos productos (PLR-1, PLR-30, PLR-34, PLR-47, PLR-49, PLR-50, PLR-51, PLR-56, PLR-59 y PLR-67) mostraron valores de *docking* entre -10,38 y -11,16; próximos al del 4-OHT (-12,50). Los productos PLR-2, PLR-10, PLR-36, PLR-37, PLR-38 y PLR-39 fueron excluidos del *docking* al no poder comprobar su estructura química de forma fidedigna (Tabla 46).

Tabla 46. Resultados del estudio de *docking* molecular de la quimioteca de los PLRx.

ID	Docking score PDB 1X7R	Docking score PDB 1ERR	Docking score PDB 3ERT
E2	-11,20	–	–
RAL	–	-14,18	-11,44
4-OHT	–	-12,50	-12,66
PLR-1	-8,13	-10,38	-8,47
PLR-2	–	–	–
PLR-3	–	-9,55	-5,99
PLR-4	-7,25	-8,84	-8,66
PLR-5	-7,88	-10,44	-7,28
PLR-6	8,60	-8,71	-8,51
PLR-7	-7,54	-9,15	-7,39
PLR-8	-7,27	-7,77	-8,63
PLR-9	–	-10,28	-9,19
PLR-10	–	–	–
PLR-11	–	-6,84	-6,52
PLR-12	–	-8,40	-7,30
PLR-13	–	-10,36	-7,53
PLR-14	–	-8,74	-7,02
PLR-15	–	-10,35	-8,37
PLR-16	–	-8,98	-7,34
PLR-17	-5,59	-10,14	-9,13
PLR-18	–	-10,26	-8,25

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

Tabla 46 (continuación). Resultados del estudio de *docking* molecular de la quimioteca de los PLRx.

ID	Docking score PDB 1X7R	Docking score PDB 1ERR	Docking score PDB 3ERT
PLR-19	–	-10,14	-7,69
PLR-20	–	-9,95	-7,14
PLR-21	–	-10,23	-8,04
PLR-22	-7,25	-9,26	-6,97
PLR-23	–	-9,07	-7,01
PLR-24	-8,79	-10,57	-7,74
PLR-25	–	-10,57	-9,26
PLR-26	–	-10,30	-8,28
PLR-27	-8,89	-10,27	-8,89
PLR-28	–	-10,31	-8,39
PLR-29	-6,62	-10,37	-8,15
PLR-30	–	-10,97	-8,30
PLR-31	–	-9,03	-7,88
PLR-32	-5,55	-10,14	-8,96
PLR-33	–	-9,85	-7,65
PLR-34	–	-10,54	-5,47
PLR-35	-7,66	-10,01	-8,97
PLR-36	–	–	–
PLR-37	–	–	–
PLR-38	–	–	–
PLR-39	–	–	–
PLR-40	–	-9,64	-5,62
PLR-41	–	-10,20	-8,36
PLR-42	–	-6,86	-7,19
PLR-43	–	-10,33	-5,97
PLR-44	–	-11,25	-7,54
PLR-45	–	-9,31	-4,25
PLR-46	–	-10,13	-6,67
PLR-47	–	-11,16	-7,97
PLR-48	–	-7,01	-8,25
PLR-49	–	-10,60	-8,41
PLR-50	–	-11,03	-8,03
PLR-51	–	-8,55	-7,74
PLR-52	–	-10,23	-6,48
PLR-53	–	-10,29	-6,35
PLR-54	–	-6,72	-6,97
PLR-55	–	-9,02	-8,52
PLR-56	–	-10,33	-8,51
PLR-57	–	-10,12	-8,03
PLR-58	-7,02	-10,24	-9,54
PLR-59	–	-10,92	-9,55
PLR-60	-8,99	-9,51	-8,06
PLR-61	-6,50	-8,36	-7,29
PLR-62	–	-8,92	-8,06
PLR-63	-8,18	-9,08	-7,33
PLR-64	-6,81	-10,29	-8,10
PLR-65	–	-8,40	-6,99
PLR-66	-5,48	-8,99	-7,74

**Tabla 46 (continuación). Resultados del estudio de *docking* molecular de la quimioteca de los PLRx.**

ID	Docking score PDB 1X7R	Docking score PDB 1ERR	Docking score PDB 3ERT
PLR-67	–	-10,44	-8,75
PLR-68	-6,32	-8,79	-7,16

Se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID) y los valores de *docking score* (en kcal/mol) para la *pose* conformacional agonista para la genisteína (G-Score PDB 1X7R) y las *poses* conformacionales antagonistas para el RAL (G-Score PDB 1ERR) y 4-OHT (G-Score PDB 3ERT).

#### 1.11.4. Primera selección de compuestos PLRx líderes

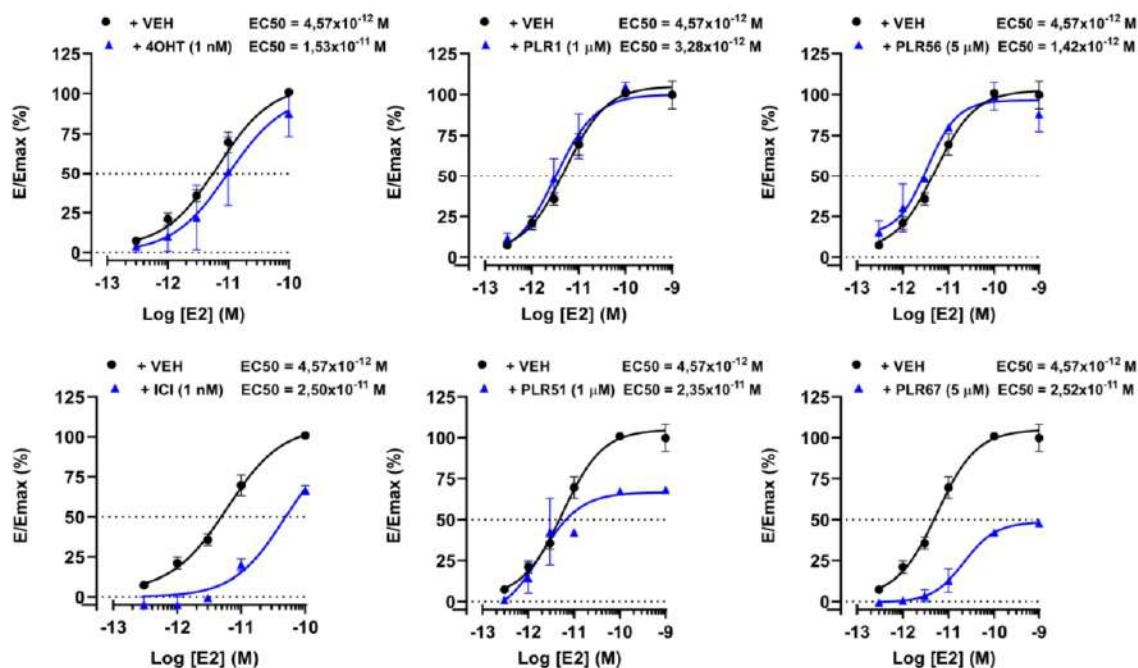
La combinación de los resultados obtenidos a partir de los ensayos del *docking* molecular, la modulación de la actividad transcripcional dependiente del ER $\alpha$  y la posible actividad antitumoral de algunos compuestos capaces de reducir la viabilidad de diversas líneas celulares de cáncer de mama, permitieron realizar una primera elección de compuestos líderes de la serie PLRx: PLR-1, PLR-51, PLR-56 y PLR-67. Posteriormente, para estos compuestos, se profundizó en su evaluación biológica, realizándose ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo, estudios para determinar su capacidad para inhibir la viabilidad y proliferación de células tumorales y experimentos de *binding* para investigar su potencial afinidad por el ER $\alpha$ .

##### 1.11.4.1. Ensayos de luciferasa para definir el tipo de antagonismo

Los PLRx preseleccionados mostraron un comportamiento antagonista cuando fueron combinados a dosis altas (5 y 10  $\mu$ M) con E2 (0,1 nM). Con el objetivo de seguir caracterizando su actividad antiestrogénica, se evaluó el tipo de antagonismo de dichos productos sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  mediante ensayos de luciferasa. Para ello, las células T47D-KBluc fueron expuestas a concentraciones submaximales de E2 ( $1 \times 10^{-14}$  –  $1 \times 10^{-9}$  M) solas (+VEH) o en combinación de los PLRx líderes a una dosis fija (5  $\mu$ M) (**Figura 58**).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I



**Figura 58.** Efectos antiestrogénicos específicos de los compuestos PLRx sobre la transcripción dependiente del ER $\alpha$  medida en ensayos de luciferasa en células T47D-KBluc. Las gráficas incluyen las curvas de dosis-respuesta del E2 ( $1 \times 10^{-14}$  –  $1 \times 10^{-9}$  M) actuando solo (+VEH, representado por  $\bullet$ ), frente a las dosis-respuesta del E2 ( $1 \times 10^{-14}$  –  $1 \times 10^{-9}$  M) en presencia de una dosis fija de los compuestos (PLR-1 y PLR-51,  $1 \mu\text{M}$ ; y PLR-56 y PLR-67,  $3 \mu\text{M}$ ; o fármacos control 4-OHT e ICI ( $10 \text{ nM}$ ), representados por  $\blacktriangle$ ). Para ello, se representan el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). En la figura se incluyen junto a la leyenda, los datos de potencia agonista (EC50) del E2 individualmente, respecto al mismo valor del E2 en presencia de la dosis fija de producto.

Los productos PLR-67 y PLR-51 exhibieron un comportamiento característico de antagonistas no competitivos como el ICI (control de antagonismo puro), ya que el aumento de dosis del agonista (E2) no fue capaz de revertir completamente el antagonismo. En concreto, PLR-51 ( $1 \mu\text{M}$ ) y PLR-67 ( $5 \mu\text{M}$ ) redujeron el efecto agonista del E2 en unas 5 veces, del mismo modo que lo hizo el ICI ( $10 \text{ nM}$ ). Sin embargo, PLR-1 y PLR-56 se comportaron como antagonistas competitivos, del mismo modo que lo hizo el 4-OHT, ya que el aumento de dosis del E2 consiguió revertir completamente el antagonismo producido por estos compuestos (**Figura 58**).

##### 1.11.4.2. Estudios de inhibición de la viabilidad celular en medio estrogénico completo

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el primer cribado fenotípico de la serie de los PLRx permitió identificar compuestos con propiedades antitumorales en modelos celulares de cáncer de mama ER+ (MCF-7) y HER2+ (SK-BR-3) (**Tabla 43**). Con el objetivo de profundizar en la evaluación de la actividad antitumoral de los cuatro PLRx preseleccionados, se procedió a estudiar su efecto en dosis-respuesta sobre la inhibición de la viabilidad celular en diferentes modelos celulares tras 48-72 horas de tratamiento en medio completo (**Tabla 47**).



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 47. Efectos de los PLRx preseleccionados sobre la viabilidad de distintos modelos celulares en condiciones de medio completo.**

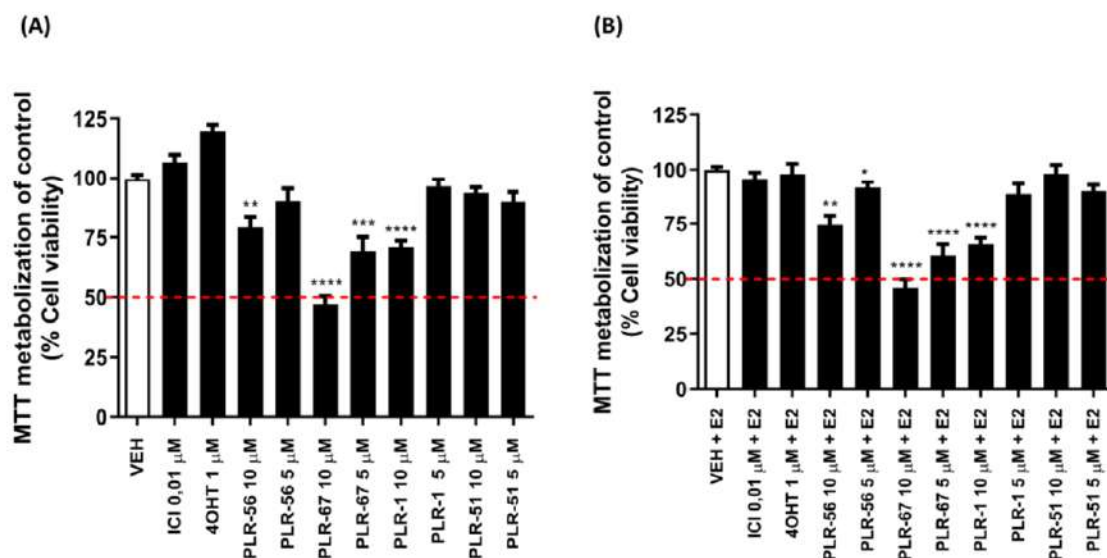
Línea Celular	IC50 ( $\mu\text{M}$ ) $\pm$ SEM					
	ICI	4-OHT	PLR-1	PLR-51	PLR-56	PLR-67
MCF-7	0,52 $\pm$ 0,16	4,43 $\pm$ 1,03	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	2,54 $\pm$ 0,49	2,59 $\pm$ 0,34
T47D	14,91 $\pm$ 5,19	5,90 $\pm$ 0,76	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	10,64 $\pm$ 0,58	5,31 $\pm$ 0,47
MCF-7/BUS	0,0006 $\pm$ 0,0002	0,09 $\pm$ nd	nd	nd	5,32 $\pm$ 2,09	2,64 $\pm$ 0,88
SK-BR-3	> 50 $\pm$ 0,0	7,85 $\pm$ 1,95	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	1,51 $\pm$ 0,09	2,00 $\pm$ 0,18
BT-549	> 10 $\pm$ 0,0	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	4,89 $\pm$ 0,96	4,19 $\pm$ 0,00
MDA-MB231	> 10 $\pm$ 0,0	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	7,63 $\pm$ 2,38	9,08 $\pm$ 0,93
Hs 578T	> 10 $\pm$ 0,0	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	8,22 $\pm$ 1,78
Ishikawa	>10 $\pm$ 0,00	6,16 $\pm$ 0,80	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	0,27 $\pm$ 0,09	1,29 $\pm$ 0,38
Vero	>10 $\pm$ 0,00	10,79 $\pm$ 0,13	>10 $\pm$ 0,00	>10 $\pm$ 0,00	14,74 $\pm$ 1,31	14,68 $\pm$ 0,13
PBMC	nd	nd	nd	nd	>30 $\pm$ 0,00	17,26 $\pm$ 6,48
MCF-10A	>10 $\pm$ 0,00	5,30 $\pm$ 0,28	7,17 $\pm$ 2,07	>10 $\pm$ 0,00	0,08 $\pm$ 0,00	3,16 $\pm$ 0,09

Se presentan los resultados de los experimentos de MTT sobre líneas celulares de cáncer de mama ER+ (MCF-7, T47D, MCF-7/BUS), HER2+ (SK-BR-3), TNBC (BT-549, MDA-MB231 y Hs 578T), cáncer de endometrio ER+ (Ishikawa) y modelos no tumorales (Vero, PBMCs y MCF-10A). Las células fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO) o productos (0,01–10  $\mu\text{M}$ ) durante 48-72 horas, excepto para las células PBMC, donde la toxicidad se evaluó sobre células quiescentes tras 24 horas de tratamiento. Los compuestos ICI y 4-OHT fueron empleados como controles antitumorales. En la tabla se incluyen el nombre de la línea celular y el valor medio (M) de IC50 ( $\mu\text{M}$ )  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de cada producto. En aquellos casos en los que no se calculó un valor numérico aparece el identificativo no determinado (nd).

Los productos PLR-56 y PLR-67 redujeron notablemente la viabilidad de todas las líneas tumorales ensayadas, con valores de IC50 entre 0,08–10,64  $\mu\text{M}$  y 1,29–9,08  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Sin embargo, PLR-1 y PLR-51 no presentaron esta misma actividad a las dosis estudiadas (IC50 >10  $\mu\text{M}$ ). Cabe destacar el efecto antitumoral de los productos PLR-56 y PLR-67 en células de endometrio ER+ (Ishikawa), con valores de IC50 de 0,27  $\mu\text{M}$  y 1,29  $\mu\text{M}$ , respectivamente (**Tabla 47**). Estos dos compuestos inhibieron, no solo la supervivencia de células de cáncer de mama y endometrio ER+, sino que también afectaron a la viabilidad de células de cáncer de mama HER2+ y TNBC (IC50 = 1,51–10  $\mu\text{M}$ ) (**Tabla 47**). Además, PLR-56 y PLR-67 mostraron una clara selectividad para las estirpes tumorales con respecto a las células no tumorales (Vero y PBMCs), en las que los valores de IC50 obtenidos para estos compuestos fueron mucho mayores (**Tabla 47**). Sin embargo, de los modelos celulares no tumorales, sólo las células de mama sanas (MCF-10A) mostraron alta sensibilidad a ambos productos, con valores de IC50 de 0,08  $\mu\text{M}$  y 3,16  $\mu\text{M}$  para PLR-56 y PLR-67, respectivamente (**Tabla 47**).

#### 1.11.4.3. Estudios de inhibición de la viabilidad de células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos

En paralelo a los ensayos de actividad transcripcional, se investigó el potencial efecto de los PLRx preseleccionados sobre la viabilidad de células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos durante 7 días y expuestas, posteriormente, a los PLRx preseleccionados (5 y 10  $\mu\text{M}$ , 3 horas) o a la combinación PLRx + E2 (0,1 nM), prolongando el tratamiento durante 24 horas (**Figura 59**).



**Figura 59.** Resultados del estudio de la viabilidad de las células T47D-KBluc medida en experimentos de MTT para los PLRx preseleccionados en condiciones de privación estrogénica. Se representan en diagrama de barras, los valores medios (Mean) y error estándar de la media (SEM) del % de viabilidad celular para cada condición de tratamiento. Los compuestos 4-OHT (1  $\mu\text{M}$ ) e ICI (0,01  $\mu\text{M}$ ) fueron utilizados como controles. En el panel izquierdo (A) se presentan los valores calculados para cada producto solo (PLRx+VEH), y en el panel derecho (B) los valores para cada producto en presencia de E2 (0,1 nM) (PLRx+E2), tras 24 horas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada condición de tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , respecto al VEH cuando los productos actuaron solos, o respecto al VEH+E2 cuando actuaron en combinación con E2.

Los resultados de estos experimentos mostraron que los compuestos PLR-1, PLR-56 y PLR-67 (10  $\mu\text{M}$ ) redujeron significativamente la viabilidad de las células (**Figura 59**), siendo el PLR-67 el producto más activo al inhibir significativamente la viabilidad celular a la dosis de 5  $\mu\text{M}$  y al alcanzar una reducción de la actividad metabólica mitocondrial próxima al 50 % a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  respecto al VEH (**Figura 59**). Además, la presencia de E2 no modificó el efecto de los productos sobre la viabilidad de las células T47D-KBluc (**Figura 59**).

#### 1.11.4.4. Estudios de inhibición de la viabilidad de células T47D privadas de estrógenos

También, se investigó el potencial efecto de los PLRx preseleccionados sobre la viabilidad de células T47D privadas de estrógenos durante 7 días y expuestas, posteriormente, a diferentes dosis de los PLRx preseleccionados (0,01–25  $\mu\text{M}$ ) durante 72 horas (**Tabla 48**).

Los resultados obtenidos en estos experimentos para los 4 PLRx evaluados (**Tabla 48**) fueron muy similares a los obtenidos previamente para estos mismos compuestos y en estas mismas células, crecidas en medio completo (**Tabla 47**), lo cual sugiere que el efecto inducido por estos productos sobre la viabilidad celular es independiente de la carga estrogénica del medio.



#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

**Tabla 48. Efectos de los PLRx preseleccionados sobre la viabilidad de células T47D en medio desprovisto de estrógenos tras 72 horas de tratamiento.**

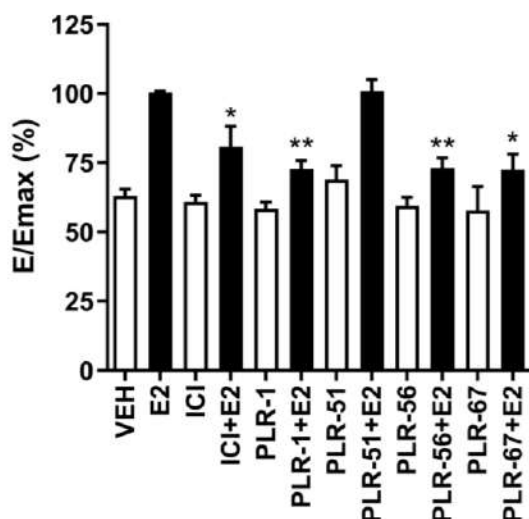
ID	T47D			
	S (%)		IC50 (µM)	
	M	SD	M	SD
<b>4-OHT</b>	101,90	1,93	5,42	0,11
<b>ICI</b>	58,78	0,87	24,10	0,00
<b>PLR-1</b>	67,05	11,01	>10	0,00
<b>PLR-51</b>	60,03	3,84	>10	0,00
<b>PLR-56</b>	64,99	8,62	15,55	0,00
<b>PLR-67</b>	98,29	1,36	3,52	1,19

Se presentan los resultados de MTT sobre células T47D tratadas con vehículo (0,05 % DMSO) o productos (0,01–25 µM) durante 72 horas en medio desprovisto de estrógenos. Los compuestos ICI y 4-OHT fueron empleados como controles antitumorales. En la tabla se incluyen el nombre identificativo (ID), el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular a la dosis de 10 µM (S, (%)), el valor medio (M) de IC50 (µM) y la desviación estándar de la media (SD) de cada compuesto.

##### 1.11.4.5. Evaluación de la proliferación celular en medio libre de estrógenos

Aunque el estudio de la viabilidad celular reveló información del estado metabólico de las células y su capacidad de supervivencia, no aportó información sobre su proliferación y dependencia de los estrógenos del medio para su crecimiento. Con el objetivo de investigar los potenciales efectos de los cuatro PLRx preseleccionados sobre estos procesos, se realizaron dos tipos de ensayos de proliferación en medio desprovisto de estrógenos: ensayos en el sistema xCelligence y ensayos en el Incucyte™ HD ZOOM, tal como se describe en la sección de Material y Métodos.

El efecto de los PLRx preseleccionados sobre la proliferación se evaluó, en primer lugar, en células tumorales ER+ (T47D) con el sistema RTCA xCelligence, que permite monitorizar el índice celular (CIx) para cada tratamiento a lo largo del tiempo (T=96h) y compararlo con respecto al efecto máximo (Emax) del E2 (0,1 nM) (**Figura 60**). Los resultados obtenidos demostraron que ninguno de los cuatro PLRx evaluados (5 µM), estimuló, por sí solo, la proliferación de las células T47D con respecto al VEH (**Figura 60**). Sin embargo, los productos PLR-1, PLR-56 y PLR-67 (5 µM), a diferencia del PLR-51, inhibieron parcialmente la estimulación de la proliferación celular inducida por E2, lo que sugiere un comportamiento como antagonistas parciales del ER (**Figura 60**).



**Figura 60. Efectos de los PLRx preseleccionados sobre la proliferación de células T47D en condiciones de privación estrogénica medidos con la tecnología xCelligence.** Las células T47D fueron crecidas y tratadas en medio libre de estrógenos (5 % DCC-FBS) durante 120h con VEH (0,05 % DMSO), E2 (0,1 nM), PLRx solos (5  $\mu$ M) o PLRx (5  $\mu$ M) + E2 (0,1 nM), comparando el efecto (E/E<sub>max</sub> (%)) de cada condición respecto al agonismo puro producido por el E2. El ICI (0,01  $\mu$ M) se empleó como control positivo de inhibición de la proliferación. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada condición de tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  respecto al VEH cuando los productos actuaron solos o respecto al VEH+E2 cuando lo hicieron en combinación con E2 0,1 nM.

Los experimentos realizados en el sistema xCelligence, aunque suponen una primera aproximación al comportamiento SERM de los productos de estudio, muestran una importante limitación en cuanto a la señal estrogénica basal del VEH. Esto puede generar una subestimación de los efectos antagonistas de los productos, que es posible corregir con otro tipo de ensayos en los que se mide la proliferación celular a tiempo real a lo largo del tiempo como el sistema Incucyte™ HD ZOOM. De esta forma, en un nuevo *set* de experimentos, se testaron los efectos de los 4 PLRx preseleccionados sobre la cinética de crecimiento de las células T47D en medio desprovisto de estrógenos durante 10 días, lo que permitió caracterizarlos según su actividad estrogénica y antiestrogénica.

Los resultados revelaron que los 4 PLRx se comportaron como antagonistas sin efectos estrogénicos sobre la proliferación celular dependiente de estrógenos. Mientras que para los productos PLR-1 y PLR-51 se obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> de entre 4–5  $\mu$ M (**Tabla 49**), los productos PLR-56 y PLR-67 mostraron una actividad antiproliferativa de 5 a 11 veces más potente que los anteriores, con valores de IC<sub>50</sub> de 0,42  $\mu$ M y 0,81  $\mu$ M, respectivamente (**Tabla 49**).



**Tabla 49. Efectos de los PLRx preseleccionados sobre la proliferación de células T47D en condiciones de privación estrogénica medidos con el Incucyte™ HD ZOOM.**

ID	T47D			
	IC50 (μM)		EC50 (μM)	
	M	SEM	M	SEM
E2	nd	nd	7,1x10 <sup>-7</sup>	2,6x10 <sup>-8</sup>
PPT	nd	nd	1,6x10 <sup>-4</sup>	6,3x10 <sup>-5</sup>
4-OHT	1,2x10 <sup>-4</sup>	0,00	nd	nd
ICI	2,8x10 <sup>-4</sup>	1,1x10 <sup>-4</sup>	nd	nd
PLR-1	4,97	0,35	nd	nd
PLR-51	4,27	0,34	nd	nd
PLR-56	0,42	0,13	nd	nd
PLR-67	0,81	0,46	nd	nd

Las células T47D fueron crecidas y tratadas en medio libre de estrógenos (5 % DCC-FBS) durante 10 días con VEH (0,05 % DMSO), E2 (0,1 nM), PPT (0,01–3 nM), ICI (0,03–10 nM), 4-OHT (0,01–10 nM) o los PLRx (0,01–10 μM), tanto solos como en combinación con E2 (0,1 nM). En la tabla se incluyen el nombre identificativo (ID), el valor medio (M) de IC50 y EC50 (μM) y la desviación estándar de la media (SD) de cada compuesto. En aquellos compuestos en los que no fue posible el cálculo de IC50 (al comportarse como agonistas) o EC50 (al comportarse como antagonistas) se incluye el identificativo no determinado (nd).

#### 1.11.4.6. Ensayos de unión o *binding* al ERα

Puesto que los PLRx líderes modulan la actividad transcripcional dependiente del ERα, se investigó si este efecto era resultado de una interacción física con el receptor. Para ello, los 4 PLRx líderes fueron evaluados por su afinidad de unión al rhERα mediante el kit LanthaScreen® TR-FRET REα. En este ensayo se utilizaron diez valores de concentración (1 x 10<sup>-4</sup> – 20 μM) de cada compuesto y los resultados obtenidos se compararon con los observados para E2, DES y 4-OHT (1 x 10<sup>-4</sup> – 20 μM) a partir de las curvas dosis-efecto obtenidas. Un mayor desplazamiento del ligando Fluormone™ ES2 del ERα implica un impedimento o reducción de su capacidad de unión al receptor y su ocupación por los compuestos de interés en función de su afinidad de unión.

Los resultados mostraron que los tres controles (DES, E2 y 4-OHT) desplazaron totalmente el ligando de la Fluorhormone™ ES2 del rhERα, estimándose un valor de IC50 de entre 4–5 x 10<sup>-5</sup> μM. El compuesto PLR-1 produjo un desplazamiento del ligando mayor del 50 % a su dosis más alta (20 μM), con un valor de IC50 de 13,3 μM (**Figura 61**). Los productos PLR-51, PLR-56 y PLR-67 desplazaron al ligando del rhERα con valores de IC50 de 26,8 μM, 32,4 μM y 27 μM, respectivamente (**Figura 61**).

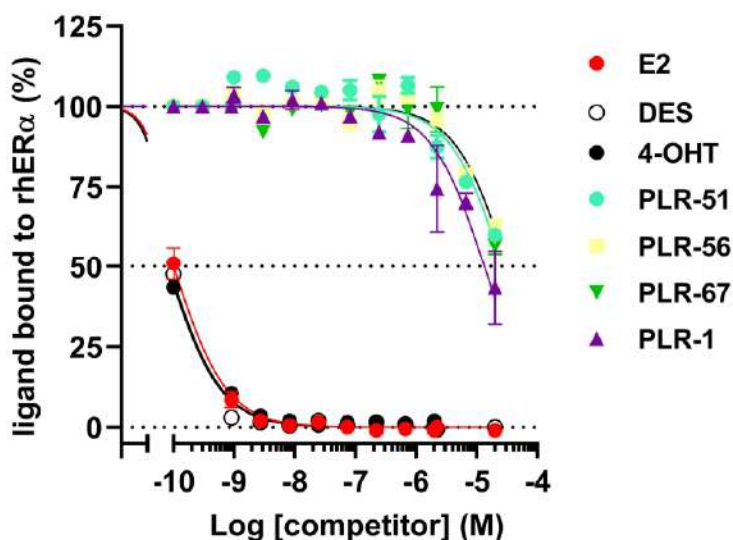


Figura 61. Estudio dosis-efecto de la afinidad de unión de los PLRx líderes al rhER $\alpha$  por desplazamiento del ligando Fluormone™ ES2. Cuantificación del porcentaje de ligando (Fluormone™ ES2) unido al rhER $\alpha$  tras la competición a diferentes dosis de los PLRx (PLR-1, PLR-51, PLR-56, PLR-67) ( $1 \times 10^{-4}$  –  $20 \mu\text{M}$ ) o los controles 4-OHT, DES y E2 ( $1 \times 10^{-4}$  –  $20 \mu\text{M}$ ).

Para validar los resultados de afinidad de los productos PLR-56 y PLR-67, se realizaron nuevos ensayos de competición con E2 tritiado (3 nM) en extractos citosólicos uterinos procedentes de ratas ovariectomizadas (RUC), enriquecidos para ER $\alpha$ , y que fueron expuestos a doce puntos de concentración de los productos ( $1 \times 10^{-4}$  –  $100 \mu\text{M}$ ). El E2 tritiado se ensayó como control agonista en una dosis-respuesta ( $1 \times 10^{-4}$  –  $2 \mu\text{M}$ ). Como se observa en la **Figura 62**, las dosis más elevadas de PLR-56 y PLR-67 disminuyeron el porcentaje de unión específica al ER $\alpha$  presente en las muestras de RUC. Además, el PLR-56 presentó un valor de IC<sub>50</sub> de  $128,4 \mu\text{M}$ , mientras que el PLR-67 registró un valor de IC<sub>50</sub> de  $76,6 \mu\text{M}$  (**Figura 62**).

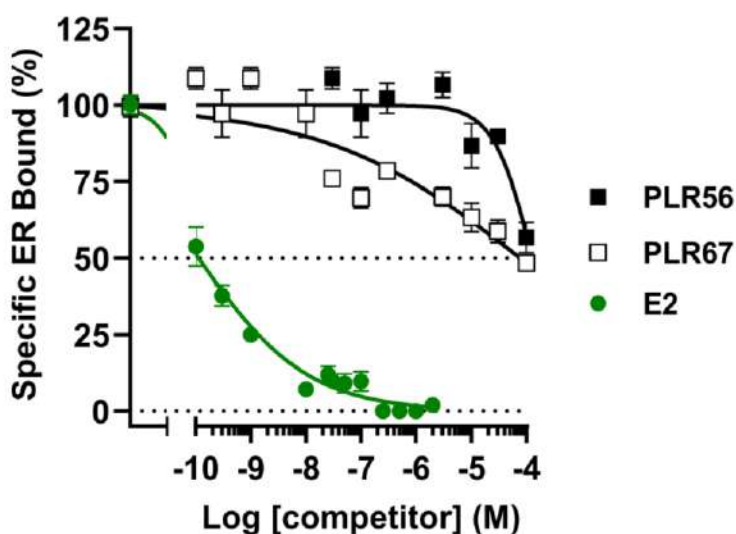


Figura 62. Estudio de la afinidad de unión de los PLR-56 y PLR-67 al ER $\alpha$  en ensayos con extractos citosólicos uterinos procedentes de ratas ovariectomizadas (RUC). Cuantificación del porcentaje de unión específica al ER $\alpha$  del E2 tritiado ( $1 \times 10^{-4}$  –  $2 \mu\text{M}$ ) o productos ( $1 \times 10^{-4}$  –  $100 \mu\text{M}$ ).

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO I

1.11.4.7. Perfil ADME

Finalmente, los 4 PLRx líderes se evaluaron mediante un estudio ADME *in silico* (QUIBIONAT). Los descriptores fisicoquímicos se calcularon con el programa QikProp, tal y como se describe en Material y Métodos, y se presentan en la **Tabla 50**.

**Tabla 50. Parámetros farmacocinéticos computacionales del estudio ADME predictivo de los compuestos PLR-1, PLR-51, PLR-56 y PLR-67.**

Propiedades	Valores recomendados	ID Compuestos evaluados			
		PLR-1	PLR-51	PLR-56	PLR-67
#stars	0-5	0	0	0	0
CNS	-2 (inactivo) a +2 (activo)	1	-2	0	-2
QPlogBB	-3,0 a +1,2	0,04	-1,27	-0,18	-1,16
QPPCaCo2	<25 deficiente >500 eficiente	3335,72	336,63	2748,83	325,64
QPPMDCK	<25 deficiente >500 eficiente	1819,10	152,50	1475,76	147,12
QPlogKhsa	-1,5 a +1,5	0,858	0,692	1,04	0,69
QPlogPo/w	-2,0 a +6,5	4,73	4,06	5,34	4,06
QPlogKp	-8,0 a +1,0	-1,04	-2,69	-0,87	-2,44
QPlogS	-6,5 a +0,5	-5,93	-6,21	-6,33	-5,52
#metab	1 a 8	2	5	5	4
%HOA	>80 % alta <25 % baja	100,00	95,90	100,00	95,70
HOA	1 (bajo), 2 (medio) o 3 (alto)	3	1	1	3
PSA	7 a 200	42,92	104,60	44,25	89,32
SASA	300 a 1000	613,43	709,09	653,98	638,27
mol MW	130 a 725	333,43	432,43	369,46	386,41
#rotor	0 a 15	1	4	3	4
donorHB	0 a 6	1	1	1	1
acceptHB	2 a 20	3,75	6,25	3,75	4,75

En la tabla se incluyen las siguientes variables de estudio: #stars (similitud con otros fármacos: (número de propiedades que están fueran del rango del 95% de los valores de los fármacos conocidos); CNS (predicción de la actividad en el sistema nervioso central (SNC) en una escala de -2 (inactivo) a +2 (activo)), QPlogBB (predicción del coeficiente de partición cerebro/sangre), QPPCaCo2 (predicción de la permeabilidad en la línea de adenocarcinoma colorrectal humana medida en nm/s), QPPMDCK (predicción de la permeabilidad en la línea de riñón canina Madin-Darby en nm/s), QPlogKhsa (predicción de la unión a la albúmina humana sérica), QPlogPo/w (predicción del coeficiente de partición Octanol/Agua), QPlogKp (predicción de la permeabilidad en la piel), QPlogS (predicción de la solubilidad acuosa), #metab (número de reacciones metabólicas probables), % HOA (predicción de la absorción oral humana de 0 al 100%), HOA (predicción cualitativa de la absorción oral humana), PSA (área de superficie de las fuerzas de Van der Waals de los átomos polares (nitrógeno, oxígeno) y de carbonilos), SASA (superficie total accesible al disolvente), MW (peso molecular), #rotor (número de enlaces rotables no-triviales y no entorpecidos), donorHB (número de donadores de enlace por puente de hidrógeno) y acceptHB (número de aceptores de enlace por puente de hidrógeno).



Las predicciones del estudio ADME predictivo estuvieron dentro del intervalo recomendado para cada parámetro farmacocinético, mostrando propiedades potencialmente favorables al respetarse las reglas de Lipinski (198,199) (**Tabla 50**). Los compuestos PLR-1 y PLR-56 mostraron una actividad intermedia (valores = 0 y 1, respectivamente) sobre el SNC, a diferencia de los productos PLR-51 y PLR-67, para los que se obtuvo una predicción de total inactividad (valor = -2), lo que, en principio, resultaría más favorable. Sin embargo, PLR-1 y PLR-56 revelaron mejores características que PLR-51 y PLR-67 en términos de permeabilidad sobre células CaCo2 (QPPCaCo2) y células Madin-Darby (QPPMDCK), sugiriendo una mayor absorción intestinal y renal de los primeros con respecto a los segundos, cuyos valores se encontraron en el rango intermedio (**Tabla 50**). El análisis comparativo entre los PLRx mostró importantes diferencias, que aportaron información relevante respecto a la elección de la posible vía de administración de los productos y sus posibles efectos *in vivo*. Los productos evaluados mostraron una predicción de alta absorción oral (%HOA y HOA), aunque paradójicamente PLR-56 y PLR-51 mostraron un valor igual a 1 para el parámetro HOA (**Tabla 50**). El buen perfil predictivo obtenido para los compuestos en lo que se refiere a una posible administración oral, contrastó con los valores predictivos de biotransformación hepática (#metab) observados, los cuales indicaron que los cuatro compuestos podrían ser sometidos a varias transformaciones metabólicas (2 para el PLR-1, 5 para los PLR-51 y PLR-56, y 4 para el PLR-67), lo que podría requerir especial atención y un estudio en mayor profundidad (**Tabla 50**). De cumplirse esto último, una alternativa podría ser la vía de administración intraperitoneal. Esta permitiría eludir parcialmente la fase de metabolismo hepático, lo que, potencialmente, podría garantizar una adecuada llegada del compuesto al órgano diana de interés.

Los principales resultados de la evaluación farmacológica preclínica de los PLRx se incluyeron en la siguiente publicación: Guerra-Rodríguez M, López-Rojas P, Amesty A, Aranda-Tavío H, Brito-Casillas Y, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B, Recio C. *Cancers*. 2022. doi:10.3390/cancers14215174 (ver Anexo II).





# **IV. RESULTADOS.**

## **CAPÍTULO II**





# Capítulo II

**Evaluación farmacológica preclínica de los  
compuestos líderes de la serie PLRx:  
PLR-56 y PLR-67**



## 1. Elección definitiva de productos líderes: PLR-56 y PLR-67

Las evidencias acumuladas en lo que se refiere a los resultados de modelado molecular, el perfil predictivo ADME, inhibición de la transcripción dependiente del ER $\alpha$ , inhibición de la viabilidad y de la proliferación celular de diversas estirpes de cáncer de mama (descritos a lo largo del Capítulo I de Resultados) condujo a la selección de los productos PLR-56 y PLR-67 como líderes de la serie. Sus actividades biológicas priorizaron su elección por delante de otros productos que también revelaron propiedades farmacológicas interesantes como, por ejemplo, PLR-1 o PLR-51. En este Capítulo II de Resultados, se amplía la caracterización de las actividades biológicas de los PLR-56 y PLR-67 y se investigan sus respectivos mecanismos de acción molecular mediante ensayos transcripcionales en otras dianas, estudios de expresión génica y proteica, ciclo celular y apoptosis, entre otros.

## 2. Ensayos de viabilidad en células de cáncer de mama ER+

### 2.1. Ensayos de viabilidad celular tras 72 horas de tratamiento

Tras haber descrito previamente (Tabla 47; Capítulo I de Resultados) los efectos de los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la viabilidad celular de diferentes estirpes celulares tumorales y no tumorales, se realizó un nuevo *set* de experimentos en los que se comparó la potencia antitumoral de ambos compuestos (72 horas de tratamiento) en tres estirpes celulares de cáncer de mama ER+ crecidas en medio completo, obteniéndose valores de IC<sub>50</sub> que se encontraron entre 2,5–10,6  $\mu$ M (Figura 63).

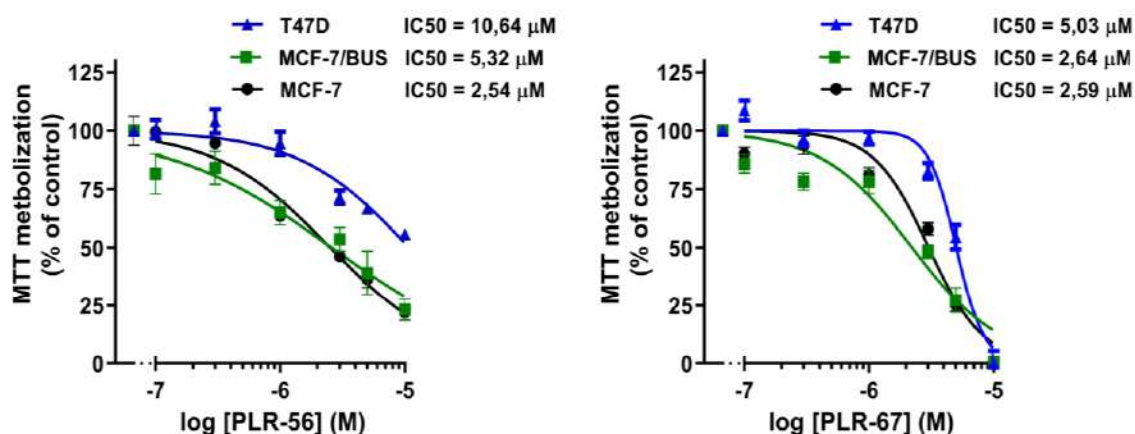


Figura 63. Gráficas dosis-efecto de los productos PLR-56 y PLR-67 en las líneas celulares MCF-7, T47D y MCF-7/BUS. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con los PLR-56 y PLR-67 en medio completo. Se calculó un valor medio de IC<sub>50</sub> para cada estirpe tumoral a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas se representan como ● para MCF-7, ▲ para T47D y ■ para MCF-7/BUS.

## 2.2. Ensayos de viabilidad celular con *wash-out*

Una vez determinada la potencia antitumoral de ambos productos en células de cáncer de mama ER+ tras 72 horas de tratamiento, a continuación, se investigó si ese efecto resultaba irreversible mediante ensayos de *wash-out*. En estos ensayos, las células MCF-7 (**Figura 64**) y T47D (**Figura 65**) fueron expuestas transitoriamente (12, 24, 48 y 72 horas) a ambos PLRx para, posteriormente, retirar el medio con los productos y determinar la viabilidad celular a punto final tras 72 horas.

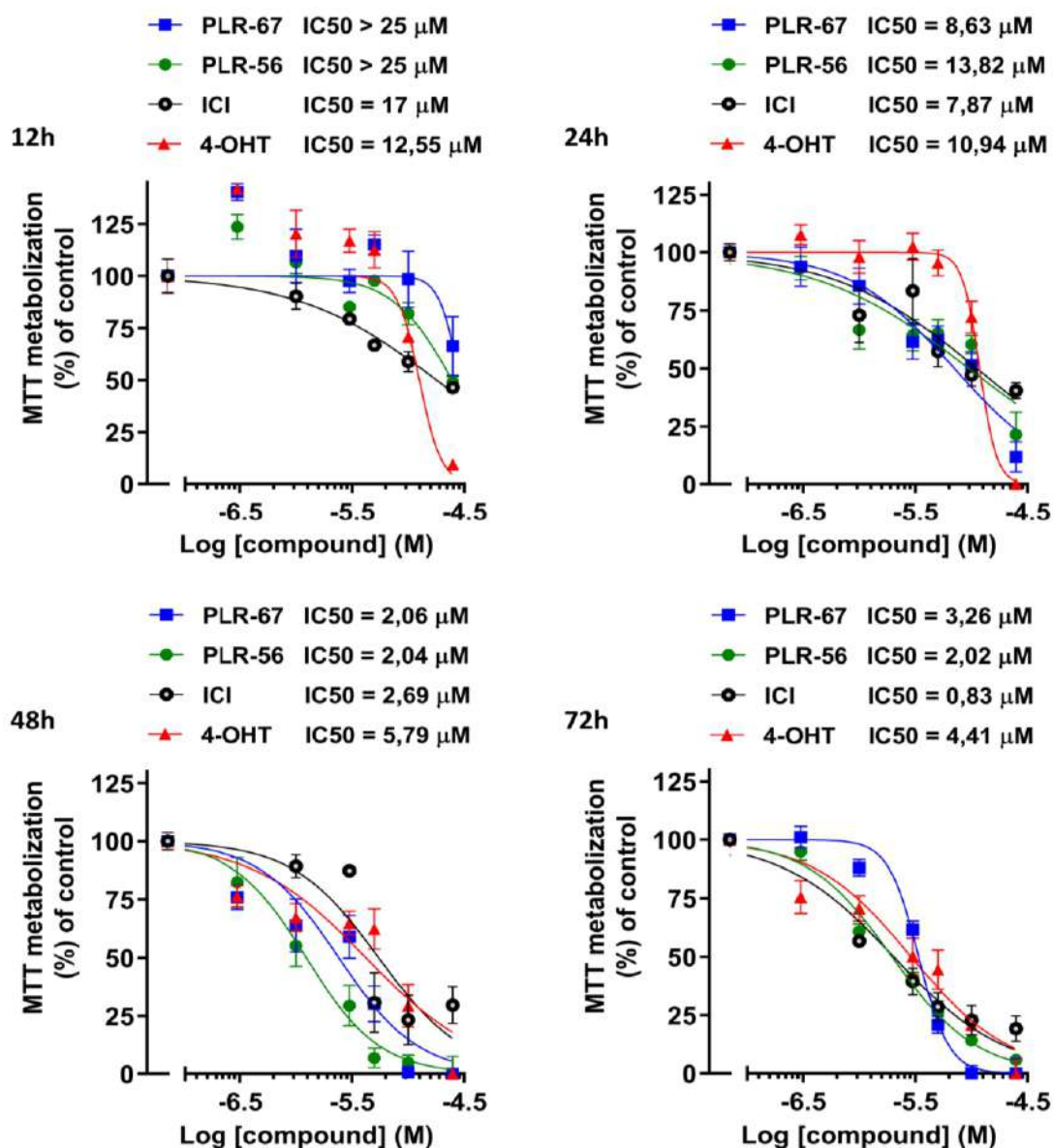


Figura 64. Estudio de los efectos irreversibles de los productos PLR-56 y PLR-67 en la viabilidad de células MCF-7. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT con *wash-out*. Las células MCF-7 fueron expuestas transitoriamente (12, 24, 48 o 72 horas) a los productos (0,3–25 μM), para posteriormente, eliminarlos del medio y determinar la viabilidad celular hasta completar 72 horas en medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas se representan como: ● para el ICI, ▲ para el 4-OHT, ■ para el PLR-67 y ● para el PLR-56.

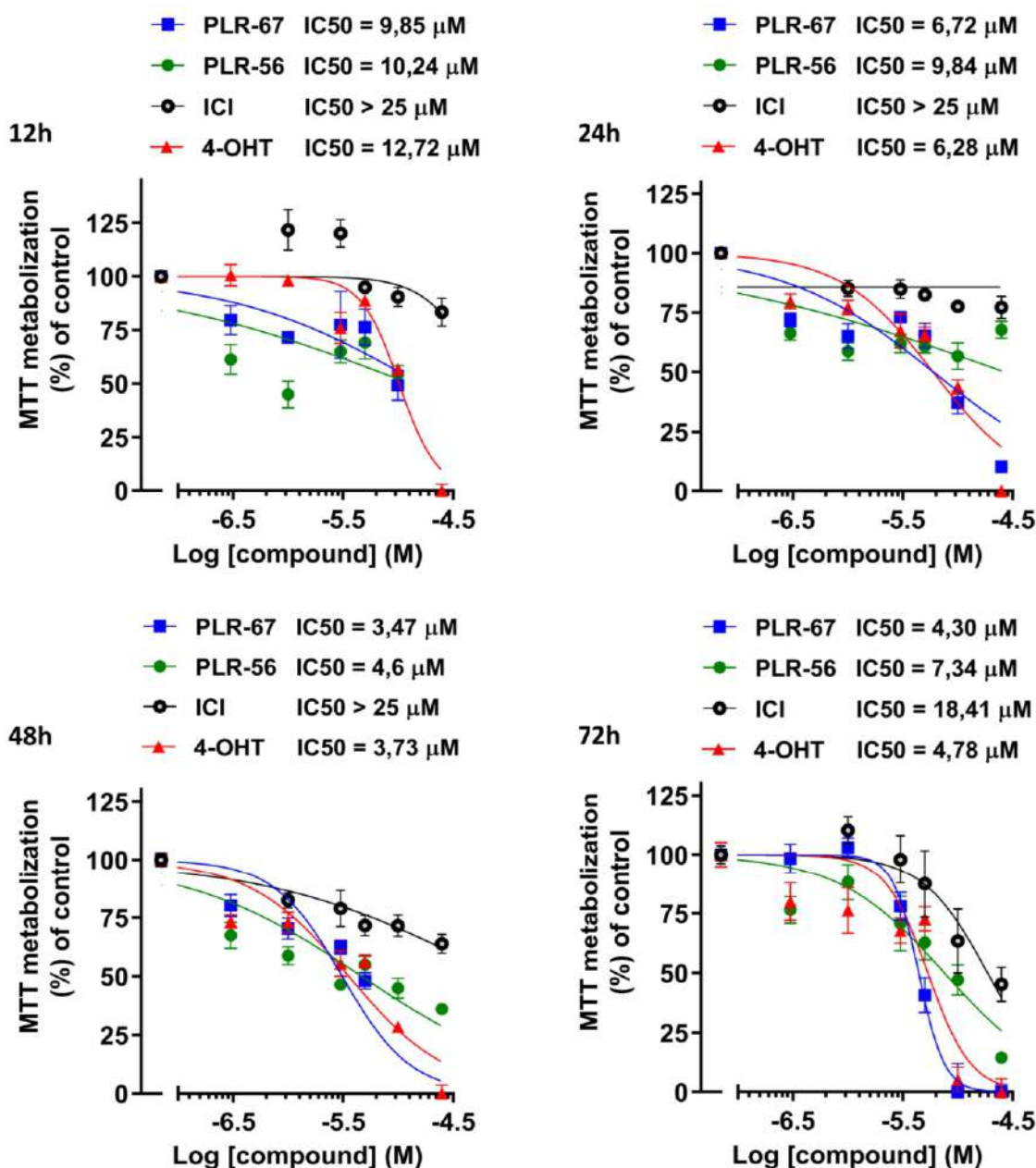


Figura 65. Estudio de los efectos irreversibles de los productos PLR-56 y PLR-67 en la viabilidad de células T47D. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT con *wash-out*. Las células T47D fueron expuestas transitoriamente (12, 24, 48 o 72 horas) a los productos (0,3–25 μM), para posteriormente, eliminarlos del medio y determinar la viabilidad celular hasta completar 72 horas en medio completo. Se calculó un valor medio de IC50 a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas se representan como: ● para el ICI, ▲ para el 4-OHT, ■ para el PLR-67 y ● para el PLR-56.

Los resultados de los experimentos de *wash-out* demostraron que los productos requerían de una exposición mínima de 12 horas para reducir la viabilidad de las células T47D (Figura 65) y de 24 horas para hacerlo en células MCF-7 (IC50 ~ 10 μM) (Figura 64). Por tanto, la actividad antitumoral de ambos PLRx líderes en células de cáncer de mama ER+ resultó dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, alcanzándose un efecto máximo tras 48 horas de tratamiento, que se prolongó hasta las 72 horas (Figuras 64 y 65).



### 2.3. Ensayos de viabilidad celular en modelos no tumorales

En ensayos de viabilidad celular de dosis-respuesta realizados anteriormente, se obtuvieron los valores de IC<sub>50</sub> de los productos PLR-56 y PLR-67 en modelos de células sanas (PBMC, Vero) y modelos tumorales de mama ER<sup>+</sup> (MCF-7), los cuales se muestran en la **Tabla 47** del Capítulo I de Resultados. Posteriormente, se hicieron nuevos experimentos para estudiar los efectos de los PLRx líderes (24 horas de tratamiento) sobre la viabilidad de células MCF-10A en crecimiento quiescente, calculándose sus potencias inhibitorias (**Tabla 51**). La combinación de estos dos *sets* de experimentos permitió la determinación de los índices de citotoxicidad (IC) para ambos productos, que se compararon con los observados para el control 4-OHT (**Tabla 51**). El cálculo se realizó mediante el cociente entre los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para los productos en células sanas y los valores de IC<sub>50</sub> determinados en células tumorales (a mayor valor de IC, menor citotoxicidad del compuesto *in vitro*, en células no tumorales).

**Tabla 51. Índices de citotoxicidad (IC) calculados a partir de los resultados de inhibición de la viabilidad celular determinada por MTT (IC<sub>50</sub>) en tres modelos celulares no tumorales (PBMC, Vero, MCF-10A) y en células tumorales de mama ER<sup>+</sup> (MCF-7).**

ID	PBMC	MCF-7	Vero	MCF-7	MCF-10A	MCF7
	IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)		IC <sub>50</sub> (μM)	
	M ± SEM	M ± SEM	M ± SEM	M ± SEM	M ± SEM	M ± SEM
PLR-56	>30 ± 0,0	2,5 ± 0,5	14,7 ± 1,3	2,5 ± 0,5	14,8 ± 4,4	2,5 ± 0,5
	IC = 12,3 ± 1,3		IC = 6,0 ± 0,7		IC = 6,0 ± 0,8	
PLR-67	17,3 ± 6,5	2,6 ± 0,3	14,7 ± 0,1	2,6 ± 0,3	5,4 ± 0,4	2,6 ± 0,3
	IC = 7,4 ± 1,0		IC = 6,3 ± 0,5		IC = 2,3 ± 0,2	
4-OHT	nd	4,4 ± 1,0	10,8 ± 0,1	4,4 ± 1,0	8,1 ± 0,8	4,4 ± 1,0
	nd		IC = 3,6 ± 0,7		IC = 2,7 ± 0,6	
DOXO	1,5 ± 0,7	0,1 ± 0,0	2,6 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0
	IC = 24,36 ± 3,89		IC = 43,56 ± 5,22		IC = 1,41 ± 0,17	

Se incluyen el nombre identificativo del compuesto (ID); de las líneas celulares comparadas dos a dos; el valor promedio (M) ± el error estándar de la media (SEM) de los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos para cada producto; y el IC resultante (M ± SD) del cociente entre los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en cada comparación respectiva de células sanas y células MCF-7. En aquellos casos en los que no se estudió o no se pudo calcular un valor numérico aparece el identificativo no determinado (nd). Los experimentos de MTT para el cálculo de los IC se realizaron tanto con células en crecimiento exponencial (Vero y MCF-7) expuestas a tratamiento durante 72 horas, como en células en crecimiento quiescente (PBMC y MCF-10A) tratadas durante 24 horas.

Los valores de IC<sub>50</sub> y los IC indicaron una baja toxicidad de los productos PLR-56 y PLR-67 en las células no tumorales estudiadas, con respecto a las células tumorales, lo cual podría ser clínicamente relevante (**Tabla 51**).



### 3. Experimentos de proliferación en células de cáncer de mama ER+

#### 3.1. Ensayos en cultivos 2D en medio completo

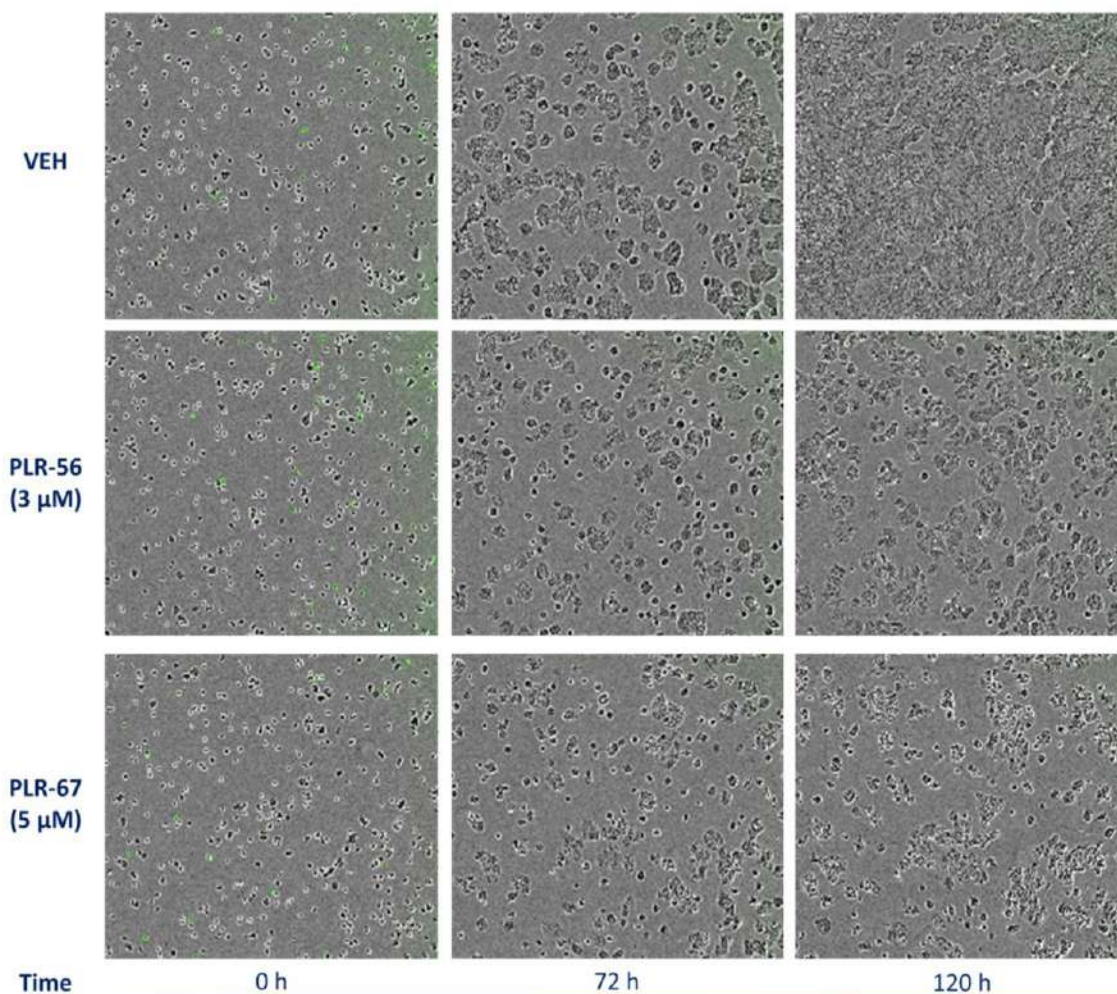
Los efectos de los PLR-56 y PLR-67 sobre la cinética de crecimiento de células tumorales de mama ER+, se investigaron con el sistema de adquisición de microfotografías a tiempo real Incucyte™ HD ZOOM, con capturas automatizadas del crecimiento celular cada 6 horas en experimentos de mayor duración (5 días) (Tabla 52). En estos ensayos se cuantificaron los efectos de ambos compuestos sobre la proliferación celular y la inducción de citotoxicidad, lo cual permitió el cálculo de los valores de IC50 y EC50 (Tabla 52).

Tabla 52. Efectos de los compuestos sobre la proliferación y citotoxicidad de células de cáncer de mama ER+.

ID	T47D				MCF-7/BUS				MCF-7			
	IC50 (µM)		EC50 (µM)		IC50 (µM)		EC50 (µM)		IC50 (µM)		EC50 (µM)	
	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM	M	SEM
DOXO	0,03	0,02	1,61	1,97	0,07	0,01	0,41	0,00	0,08	0,03	1,57	1,21
4-OHT	5,54	0,81	6,18	0,11	1,90	nd	5,33	nd	5,53	nd	6,23	nd
ICI	>25	0,00	>25	0,00	2,5x10 <sup>-4</sup>	0,00	nd	nd	0,28	0,36	>25	0,00
PLR-56	5,34	2,47	>10	0,00	2,63	1,14	7,81	3,10	1,52	1,25	>10	0,00
PLR-67	6,98	1,15	>10	0,00	4,24	1,27	>10	0,00	4,30	0,77	>10	0,00

Se presentan los resultados de los experimentos de proliferación-citotoxicidad realizados con líneas celulares de cáncer de mama ER+ (MCF-7, T47D, MCF-7/BUS) crecidas y tratadas con VEH (0,05 % DMSO) o productos en dosis-respuesta (0,01 – 10 µM) durante 5 días con medio completo. Los compuestos DOXO, ICI y 4-OHT fueron empleados como controles antitumorales. En la tabla se incluyen el nombre identificativo de cada producto (ID); la línea celular; el valor medio de inhibición de la proliferación celular en términos de IC50 (M) (en µM) ± el error estándar de la media (SEM); y el valor medio de citotoxicidad en términos de EC50 (M) (en µM) ± SEM para cada producto.

Los productos PLR-56 y PLR-67 interfirieron notablemente en la proliferación de todas las líneas celulares de cáncer de mama ER+ ensayadas, con valores de IC50 entre 1,5–5,3 µM y 4,2–7 µM, respectivamente. Ambos compuestos resultaron más potentes en células MCF-7 y MCF-7/BUS que en células T47D (Tabla 52). La cinética de crecimiento de las células MCF-7 se representa en la Figura 66 a partir de microfotografías tomadas tras 0, 72 y 120 horas de tratamiento con los PLRx líderes.

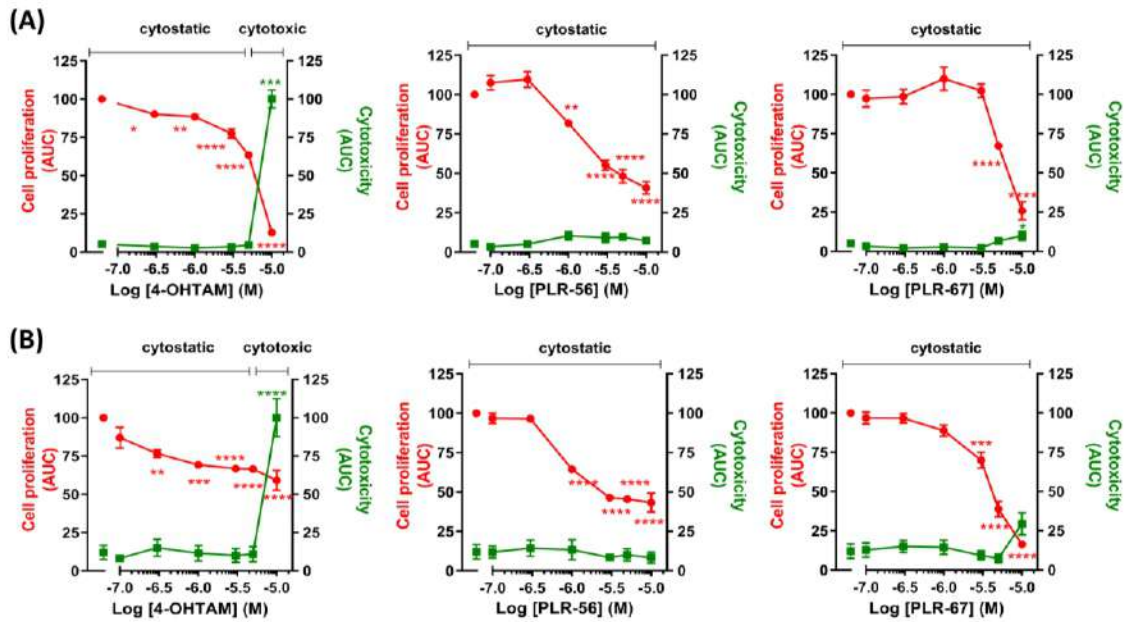


**Figura 66. Monitorización microfotográfica del efecto de los compuestos PLRx líderes sobre la proliferación y citotoxicidad de células MCF-7.** Representación fotográfica de la cinética de crecimiento exponencial (en contraste de fases) y citotoxicidad (en el canal de fluorescencia verde) de células MCF-7 tratadas con VEH (0,05 % DMSO), PLR-56 (3  $\mu\text{M}$ ) o PLR-67 (5  $\mu\text{M}$ ) tras 0, 72 y 120 horas de tratamiento en condiciones de medio completo.

Los productos PLR-56 y PLR-67 se comportaron como agentes citostáticos con una baja citotoxicidad en los tres tipos celulares, con la excepción del PLR-56, cuya dosis más alta utilizada, produjo una citotoxicidad por encima del 50 % en células MCF-7/BUS ( $\text{EC}_{50} = 7,81 \mu\text{M}$ ) (**Tabla 52**). Los productos inhibieron significativamente la proliferación celular de células T47D a 1, 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$  (**Figura 67A**); y a 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$  en células MCF-7 (**Figura 67B**). El 4-OHT indujo citotoxicidad a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  en ambas líneas estrógeno-dependientes, inhibiendo la proliferación de las células T47D a 5 y 10  $\mu\text{M}$ ; y a 1 y 3  $\mu\text{M}$  en células MCF-7 (**Figura 67**).

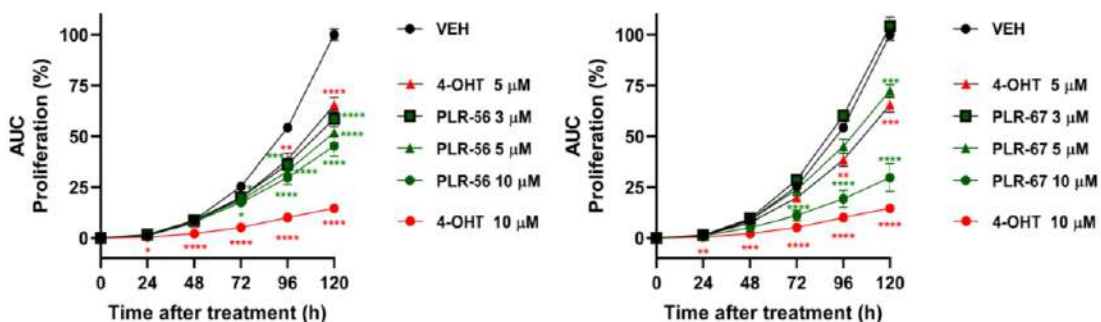


#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



**Figura 67. Efectos de los compuestos sobre la proliferación y la citotoxicidad de células T47D y MCF-7 en medio completo.** Representación de las gráficas del área bajo la curva (AUC) en términos de confluencia o proliferación en contraste de fases (eje Y izquierdo) y confluencia fluorescente verde o citotoxicidad (eje Y derecho) de los productos (PLR-56, PLR-67 y 4-OHT) sobre (A) células T47D y (B) MCF-7. Las células fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO) o diferentes dosis de compuestos (0,01–10  $\mu$ M) durante 5 días en condiciones de medio completo. Se representan los valores medios  $\pm$  error estándar de la media de confluencia y citotoxicidad, para cada dosis a tiempo final, comparando respecto al máximo crecimiento celular en presencia de VEH y de la máxima citotoxicidad inducida por el 4-OHT a 10  $\mu$ M. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a las células no tratadas (VEH).

El sistema Incucyte™ HD ZOOM permitió, además, caracterizar los efectos antiproliferativos de los PLR-56 y PLR-67 en una cinética de crecimiento a las dosis más altas (3, 5 y 10  $\mu$ M) comparando los valores obtenidos con respecto a los del 4-OHT (5 y 10  $\mu$ M) a lo largo del tiempo (Figura 68).

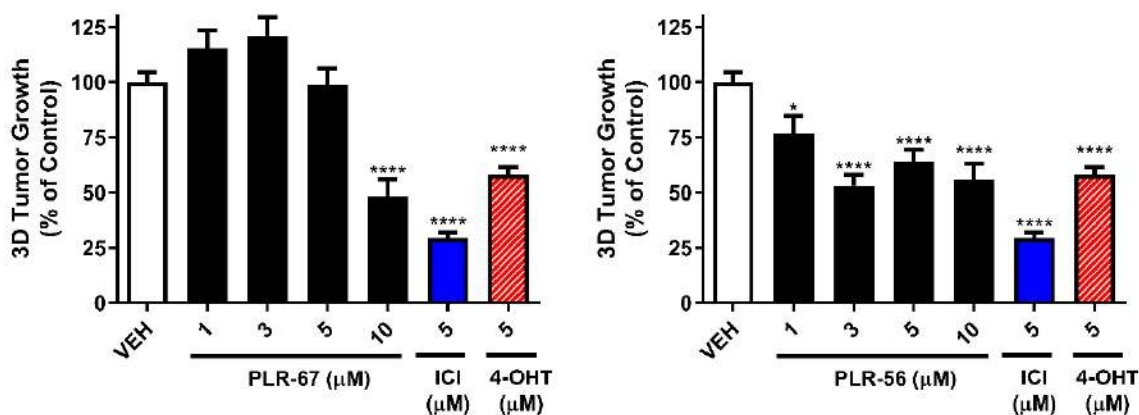


**Figura 68. Representación de los efectos antiproliferativos de los PLRx líderes en estudios dosis-tiempo en células T47D crecidas en medio completo.** Se representan los valores de la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del % de proliferación celular para cada dosis estudiada (calculada en función de su AUC) respecto al tiempo (0–120h). Las células se trataron con VEH, (0,05 % DMSO) o diferentes dosis de PLRx (3, 5 y 10  $\mu$ M) o 4-OHT (5 y 10  $\mu$ M) durante 5 días en condiciones de medio completo. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a las células no tratadas (VEH).

El análisis de la cinética de crecimiento permitió determinar que, mientras el 4-OHT inhibía significativamente la proliferación celular desde las 24 horas de tratamiento a su dosis más alta (10  $\mu\text{M}$ ), los PLR-56 (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) y PLR-67 (10  $\mu\text{M}$ ) necesitaban de, al menos, 72 horas de tratamiento para empezar a inducir efectos antiproliferativos. Después de 96 horas de tratamiento, los tres compuestos inhibieron significativamente la proliferación celular (**Figura 68**). Por tanto, estos ensayos de dosis-tiempo permitieron determinar las dosis más eficaces de los compuestos y el tiempo de tratamiento necesario para inhibir el crecimiento de las células de cáncer de mama ER+.

### 3.2. Ensayos en cultivos 3D en medio completo

Los cultivos 2D aportan información importante para la caracterización de los efectos farmacológicos de los compuestos, especialmente en términos de viabilidad celular, proliferación y citotoxicidad. Sin embargo, los cultivos de esferoides en 3D simulan mejor el comportamiento de los tumores *in vivo* (200,201). Por ello, se investigaron los efectos de los PLR-56 y PLR-67 en dosis-respuesta sobre el crecimiento de esferoides tumorales de células T47D durante 8 días (**Figura 69**), documentando el proceso con el sistema de adquisición de microfotografías a tiempo real Incucyte™ SX5 y su módulo de adquisición de esferoides, tal como se describe en Material y Métodos.

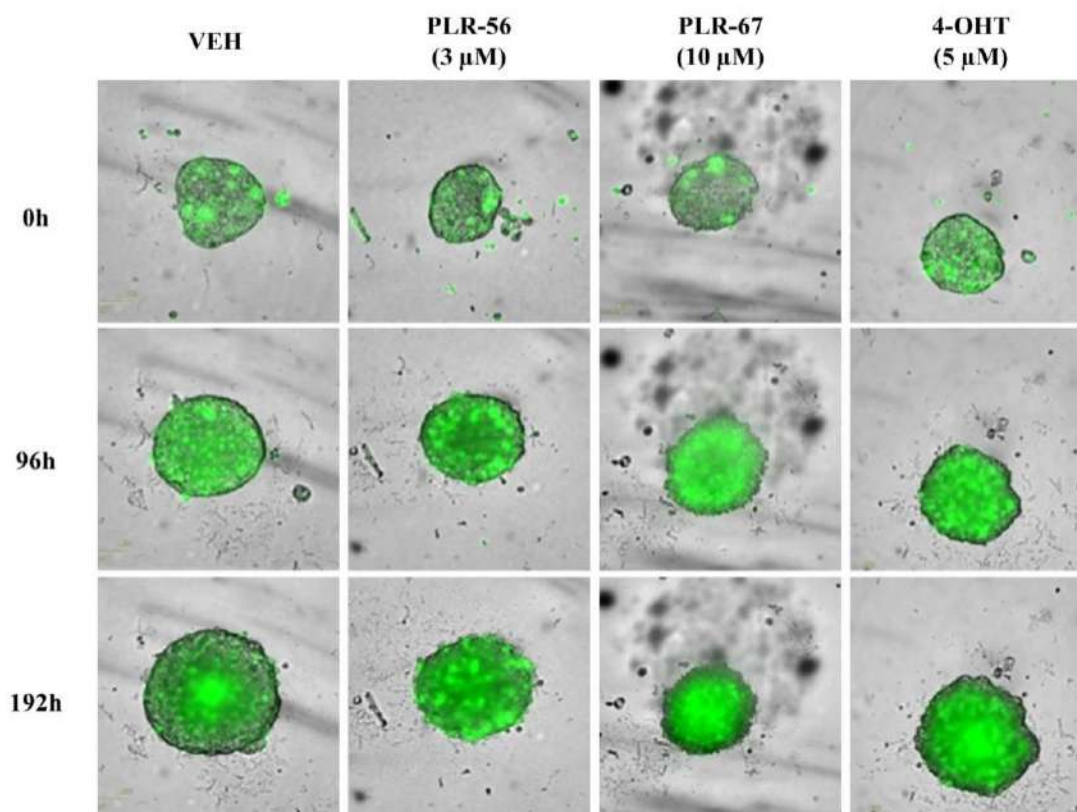


**Figura 69.** Efecto de los PLR-56 y PLR-67 sobre el crecimiento tumoral 3D de esferoides de cáncer de mama ER+. Representación en diagrama de barras de la inhibición del crecimiento tumoral de esferoides (3D) de células T47D, en condiciones de medio completo. Las células se trataron con VEH (0,05 % DMSO), PLR-56, PLR-67 (1–10  $\mu\text{M}$ ) o los controles 4-OHT e ICI (5  $\mu\text{M}$ ) durante 8 días. Se representan la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) del % de crecimiento tumoral de cada tratamiento con respecto a las células no tratadas (VEH). El análisis estadístico se realizó mediante prueba ANOVA de una vía aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a las células no tratadas (VEH).

Los estudios con los esferoides de células T47D revelaron que tanto PLR-56 como PLR-67 reproducían sus efectos antiproliferativos previamente observados en los cultivos 2D. Ambos productos inhibieron significativamente el crecimiento de los esferoides (1, 3, 5 y 10  $\mu\text{M}$  para el



PLR-56 y 10  $\mu\text{M}$  para el PLR-67), si bien, sus efectos resultaron ligeramente menos potentes que en los cultivos 2D (**Figura 69**). Además, se analizaron las microfotografías de los esferoides de células T47D a diferentes tiempos (0, 96 y 192 horas) combinando microscopía de campo claro (*Brightfield Object Area,  $\mu\text{m}^2$* ) y el canal de fluorescencia verde para detectar el YOYO-1 (*Green Object Area,  $\mu\text{m}^2$* ), con el objetivo de obtener información adicional sobre la potencial citotoxicidad de los productos en estudio (**Figura 70**).



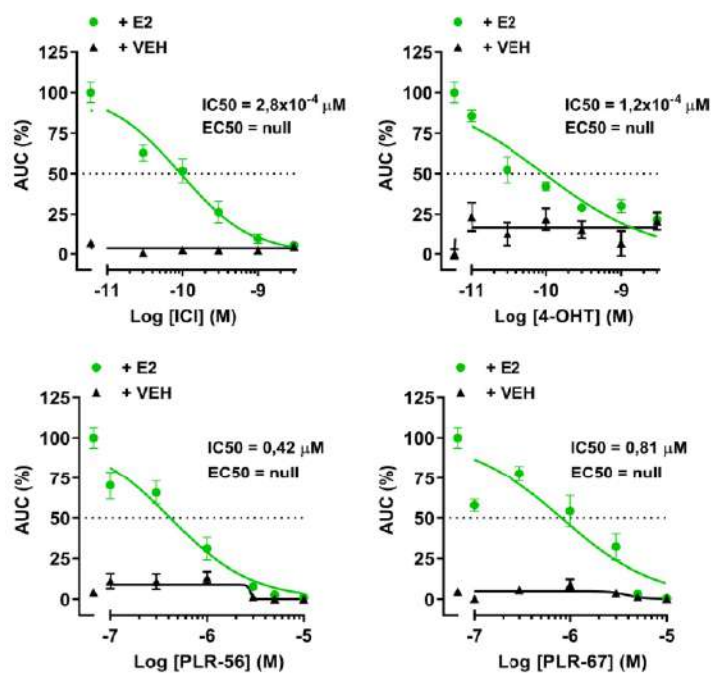
**Figura 70. Monitorización microfotográfica del efecto de los compuestos sobre el crecimiento y la citotoxicidad de esferoides de células T47D.** Representación fotográfica de la cinética de crecimiento (combinando microscopía de campo claro, *Brightfield* y citotoxicidad, en el canal de fluorescencia verde) de células T47D tratadas con VEH (0,05 % DMSO), PLR-56 (3  $\mu\text{M}$ ), PLR-67 (10  $\mu\text{M}$ ) o el control 4-OHT (5  $\mu\text{M}$ ) tras 0, 96 y 192 horas en condiciones de medio completo.

Los ensayos 3D permitieron observar que ambos compuestos reducían el crecimiento e incrementaban la cantidad e intensidad de la señal verde (citotoxicidad) en los esferoides de células T47D (marcaje homogéneo tanto en la zona central como periférica de los esferoides), con respecto a los esferoides no tratados (VEH). De esta forma, en los esferoides tratados con el VEH, la señal verde indicativa de citotoxicidad se observó mayoritariamente en el centro del esferoide, posiblemente por la deprivación de nutrientes del medio a lo largo del tiempo de crecimiento y por el menor acceso de las células al oxígeno en esta zona (**Figura 70**). El fármaco control 4-OHT (5  $\mu\text{M}$ ) redujo el volumen de los tumores con un marcaje homogéneo en el núcleo y la periferia de estos (**Figura 70**).

Las evidencias recopiladas a lo largo de todos los experimentos en los que se estudiaron los efectos antiproliferativos en cultivos 2D y 3D de diferentes estirpes de cáncer de mama ER+ permitieron identificar a los productos PLR-56 y PLR-67 como potentes agentes antitumorales que se comportan como citostáticos de acción lenta, pero sostenida, con escasa inducción de citotoxicidad.

### 3.3. Ensayos en cultivos 2D en medio desprovisto de estrógenos

Puesto que los ensayos antiproliferativos (2D y 3D) se realizaron en condiciones de medio completo, no se pudieron estudiar los posibles efectos estro/antiestrogénicos de los productos PLR-56 y PLR-67 sobre la proliferación de células de cáncer de mama ER+. Para ello, se realizó otro *set* de experimentos de larga duración (10 días) en células T47D deprivadas de estrógenos en presencia o ausencia de E2, usando de nuevo el sistema de adquisición de microfotografías a tiempo real Incucyte™ HD ZOOM, tal como se describe en Material y Métodos (**Figura 71**).

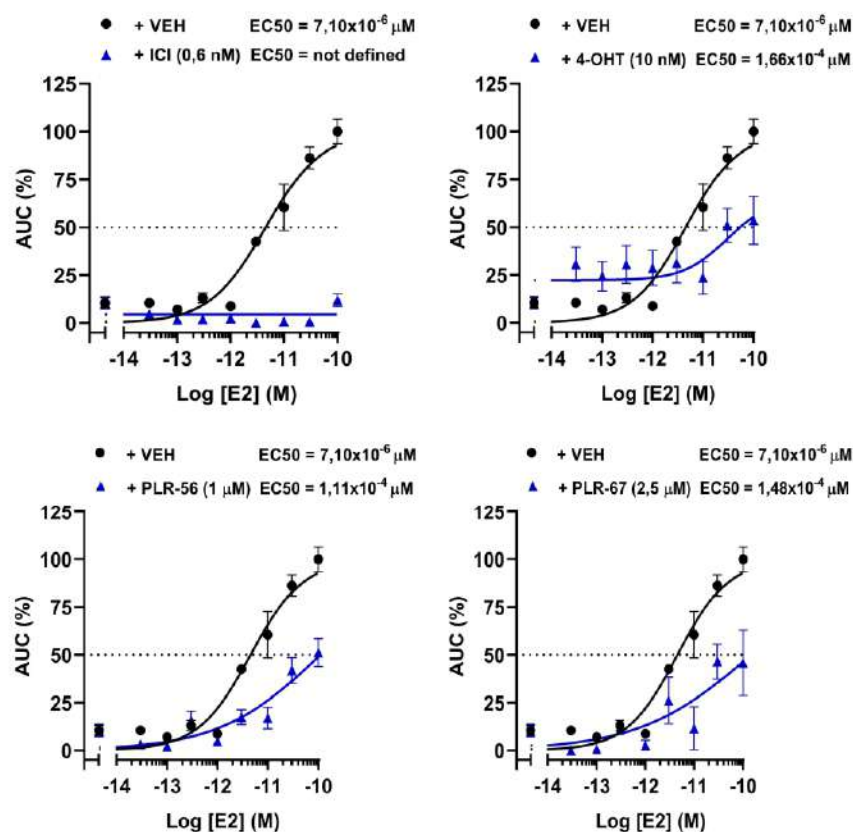


**Figura 71.** Efectos antiestrogénicos de los PLRx sobre la proliferación inducida por E2 en células T47D. Las células T47D se trataron con VEH (0,05 % DMSO) o compuestos (0,01–10  $\mu$ M) en ausencia (VEH,  $\blacktriangle$ ) o presencia de E2 (0,1 nM,  $\bullet$ ) durante 10 días en condiciones de deprivación estrogénica (5 % de DCC-FBS) tras lavados durante 7-10 días (10 % de DCC-FBS). ICI (0,03–10 nM) y 4-OHT (0,01–3 nM) fueron empleados como controles de antagonismo. Se calculó la cinética de crecimiento celular mediante la expresión matemática del área bajo la curva (AUC) para los compuestos actuando solos (+VEH) o en presencia de E2 (0,1 nM), y luego se aplicó un análisis de regresión no lineal para calcular los efectos dosis-respuesta de los compuestos ( $IC_{50}$  o  $EC_{50}$ ) sobre el AUC, representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente al % de AUC respecto a las células no tratadas (VEH).

Los experimentos realizados con células T47D en medio deprivado de estrógenos y en ausencia de E2, demostraron que ni PLR-56 ni PLR-67 estimulaban el crecimiento celular (agonismo nulo,  $EC_{50} = null$ ) (**Figura 71**). Sin embargo, estos mismos ensayos realizados en



presencia de E2, permitieron categorizar a los productos como antagonistas de la proliferación dependiente de estrógenos con valores de IC<sub>50</sub> de 0,42  $\mu\text{M}$  y 0,81  $\mu\text{M}$  para el PLR-56 y PLR-67, respectivamente (**Figura 71**). Posteriormente, se identificó el tipo de antagonismo que subyace a la inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama ER<sup>+</sup> estimuladas con E2. Para ello, se estableció un segundo diseño experimental, donde las células T47D deprivadas y sembradas en ausencia de estrógenos, se expusieron a concentraciones submaximales de E2 ( $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) en ensayos de dosis-respuesta, en ausencia o presencia de una dosis fija de cada uno de los PLRx (**Figura 72**).

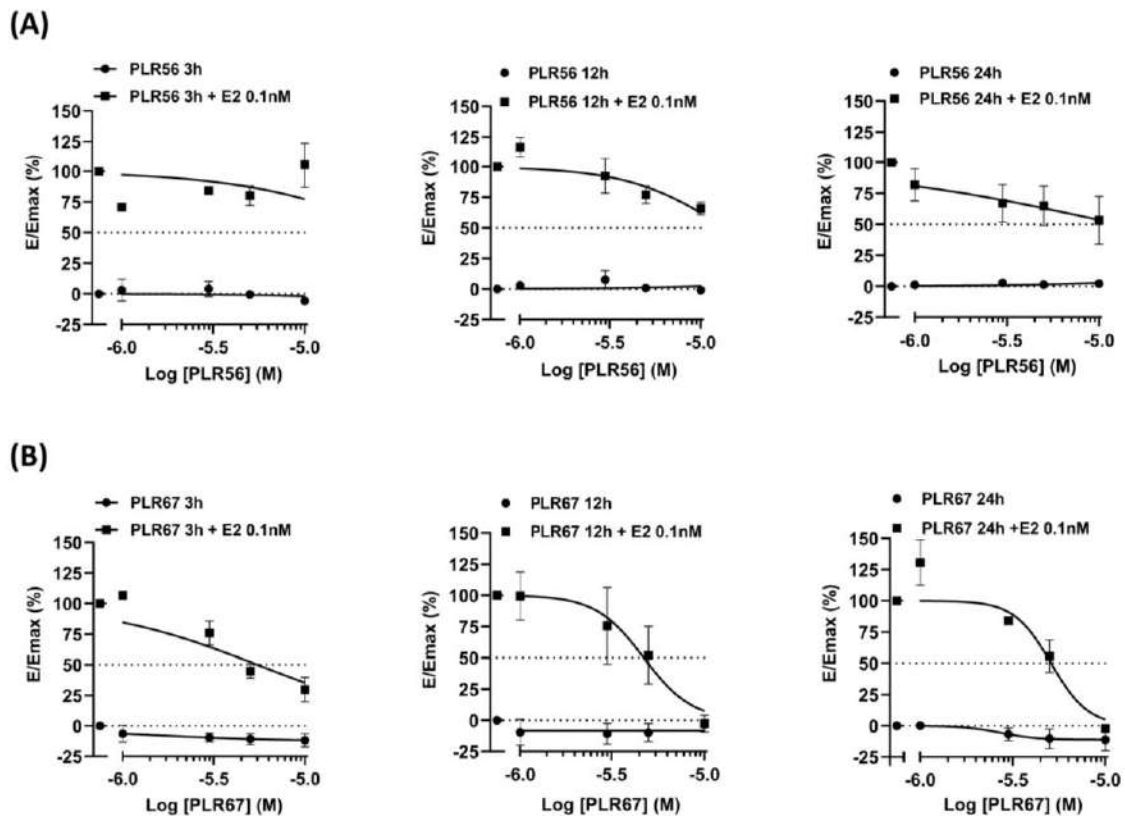


**Figura 72.** Efectos antagonistas específicos de los PLRx sobre la proliferación dependiente de estrógenos de células T47D. Se representan las gráficas que incluyen las curvas de dosis-respuesta del E2 ( $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) actuando solo (+VEH, representado por ●) frente a las dosis-respuesta del E2 ( $1 \times 10^{-8}$  –  $1 \times 10^{-4}$   $\mu\text{M}$ ) en presencia de una dosis fija de compuesto (PLR-56 (1  $\mu\text{M}$ ), PLR-67 (2,5  $\mu\text{M}$ ), ICI (0,6 nM) o 4-OHT (10 nM), representado por ▲). Se calculó la cinética de crecimiento celular mediante la expresión matemática del área bajo la curva (AUC) para el E2 solo o E2 + compuestos y luego se aplicó un análisis de regresión no lineal para calcular sus respectivos valores de EC<sub>50</sub>, representando el logaritmo decimal de la concentración de E2 frente al % de AUC con respecto a las células tratadas con E2.

Los resultados de estos experimentos permitieron categorizar a ambos PLRx como antagonistas no competitivos de la proliferación dependiente de estrógenos, ya que el aumento de dosis del agonista (E2) no consiguió revertir completamente el antagonismo inducido por estos. De esta forma, la EC<sub>50</sub> del E2 se vio incrementada (pérdida de potencia agonista) en unas 16 y 21 veces para el PLR-56 y PLR67, respectivamente (**Figura 72**).

#### 4. Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente del ER $\alpha$

En el capítulo I de "Resultados" se describió la existencia de inhibición de la actividad transcripcional dependiente del ER $\alpha$  para el PLR-67 (IC<sub>50</sub> = 5–10  $\mu$ M) y la ausencia de este efecto para el PLR-56 (véase **Figura 57**). En el diseño experimental utilizado, los productos de estudio fueron preincubados durante tan solo 3 horas, antes de la adición del E2 (0,1 nM). Sin embargo, paradójicamente, el PLR-56 exhibió una potente actividad antitumoral en células de cáncer de mama ER+, inhibiendo notablemente tanto la viabilidad (véase **Figura 63**) como la proliferación celular (véase **Figuras 67, 69, 71 y 72**). Estos resultados llevaron a que se plantease la posibilidad de si la ampliación del tiempo de preincubación podría tener un efecto sobre la transcripción dependiente del ER $\alpha$ . Con este objetivo y utilizando el mismo diseño experimental descrito con anterioridad, las células T47D-KBluc sembradas en condiciones de privación estrogénica, fueron sometidas a diferentes tiempos de preincubación (3, 12 y 24 horas) con ambos PLRx, antes de la adición de E2 (0,1 nM) al medio (**Figura 73**).



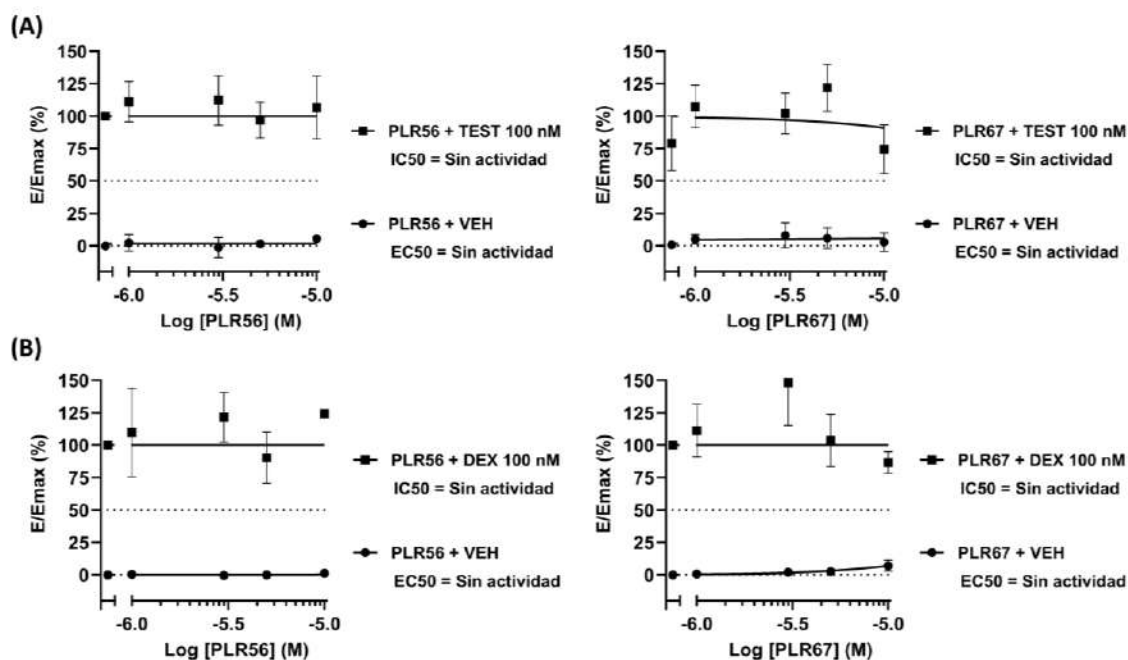
**Figura 73.** Efectos de diferentes tiempos de preincubación con los productos PLR-56 y PLR-67 sobre la transcripción dependiente de ER $\alpha$  en células T47D-KBluc deprivadas de estrógenos. Se incluyen las gráficas de los compuestos (A) PLR56 y (B) PLR-67 a diferentes tiempos de preincubación (3, 12 y 24 horas), representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia encontrada con el ligando natural E2 (100 % del efecto). Las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se representan como ● y las dosis de producto actuando en presencia de E2 (0,1 nM) se representan como ■.



Estos ensayos mostraron que el PLR-56 necesitó de, al menos, 12 horas de preincubación para inhibir significativamente la transcripción mediada por el ER $\alpha$  e inducida por el E2 (**Figura 73A**). Sin embargo, el compuesto PLR-67 produjo una inhibición similar de la transcripción mediada por el ER $\alpha$  e inducida por el E2 a todos los tiempos de preincubación testados (**Figura 73B**). Por tanto, y en este contexto, parece que el PLR-56 es un producto con un mecanismo de acción más lento que el PLR-67.

## 5. Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente de los AR y GR

Una de las preguntas que emerge a partir del efecto modulador que PLR-56 y PLR-67 ejercen sobre el ER $\alpha$  en cáncer de mama, se refiere a la posibilidad de que este no sea del todo específico y afecte también a otros receptores de la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas (AR y GR), debido al alto grado de homología en el dominio LBD que presentan estos receptores. Con el objetivo de dar respuesta a esta pregunta, se estudiaron los potenciales efectos moduladores de los compuestos PLRx líderes sobre la actividad transcripcional dependiente del AR o GR en células MDA-kb2. Las células MDA-kb2 fueron tratadas con los compuestos PLRx (1–10  $\mu$ M) en ausencia (+VEH) o en presencia de DEX (100 nM) para el GR o TEST (100 nM) para el AR (**Figura 74**).



**Figura 74.** Efectos de los PLRx sobre la transcripción dependiente de AR o GR medida en ensayos de luciferasa en células MDA-kb2. Se incluyen las gráficas de los PLR-56 y PLR-67, representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia (100 %) encontrada con (A) TEST (100 nM) y (B) DEX (100 nM). Las dosis de los compuestos en ausencia de TEST o DEX (+VEH) se representan como ● y las dosis de estos en presencia de TEST o DEX se representan como ■.

Los resultados obtenidos mostraron que ninguno de los PLRx presentó actividad agonista sobre AR o GR (Figura 74). Del mismo modo, ni PLR-56 ni PLR-67 ejercieron efectos inhibitorios sobre la transcripción mediada por AR o GR e inducida por TEST o DEX, respectivamente (Figura 74).

## 6. Experimentos de luciferasa para estudiar la transcripción dependiente de STAT3 y STAT5

Comprobada la ausencia de inhibición sobre otros factores de transcripción nucleares activados por ligando (receptores de hormonas esteroideas: AR y GR), se procedió a investigar si los PLRx eran capaces de modular la actividad de otro tipo de factores de transcripción, como son las proteínas STAT. Para abordar experimentalmente este objetivo, se emplearon dos líneas celulares transfectadas establemente con el *reporter gene* de luciferasa acoplado a sendos promotores de respuesta a STAT3 (células HEK293) y STAT5 (células Ba-F3). En los ensayos se testaron los efectos de los dos PLRx (1–10  $\mu$ M, 24 horas de tratamiento) en ausencia (+VEH) o en presencia de IL-6 (10 ng/ml) o IL-3 (30 ng/ml), que estimulan la transcripción dependiente de STAT3 (Figura 75) y STAT5 (Figura 76), respectivamente.

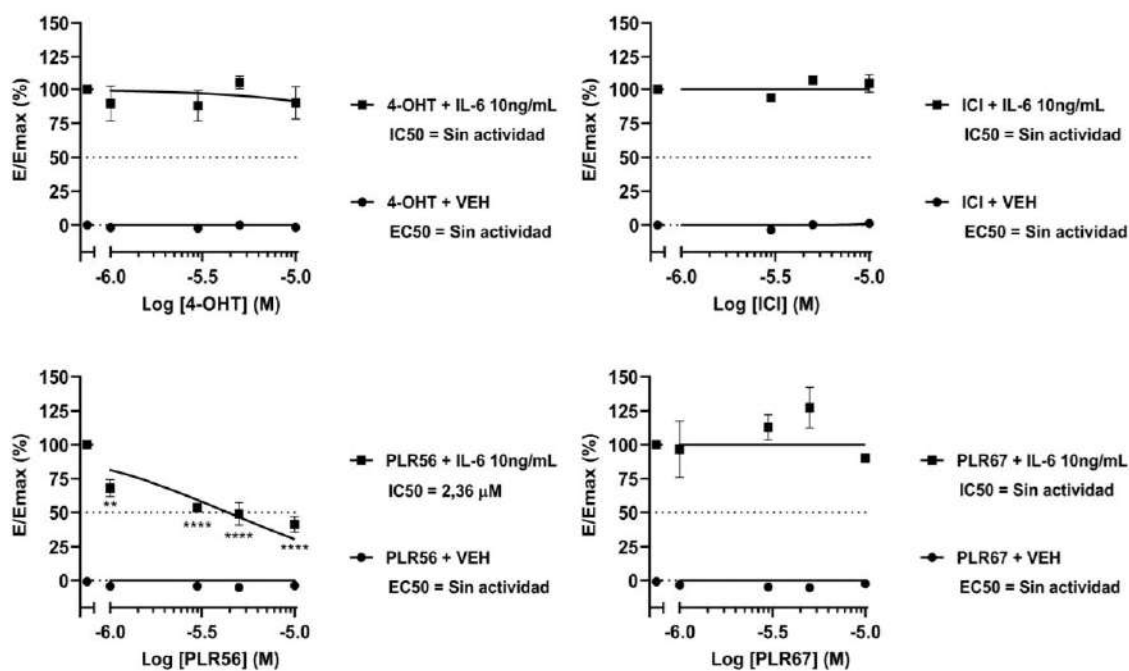
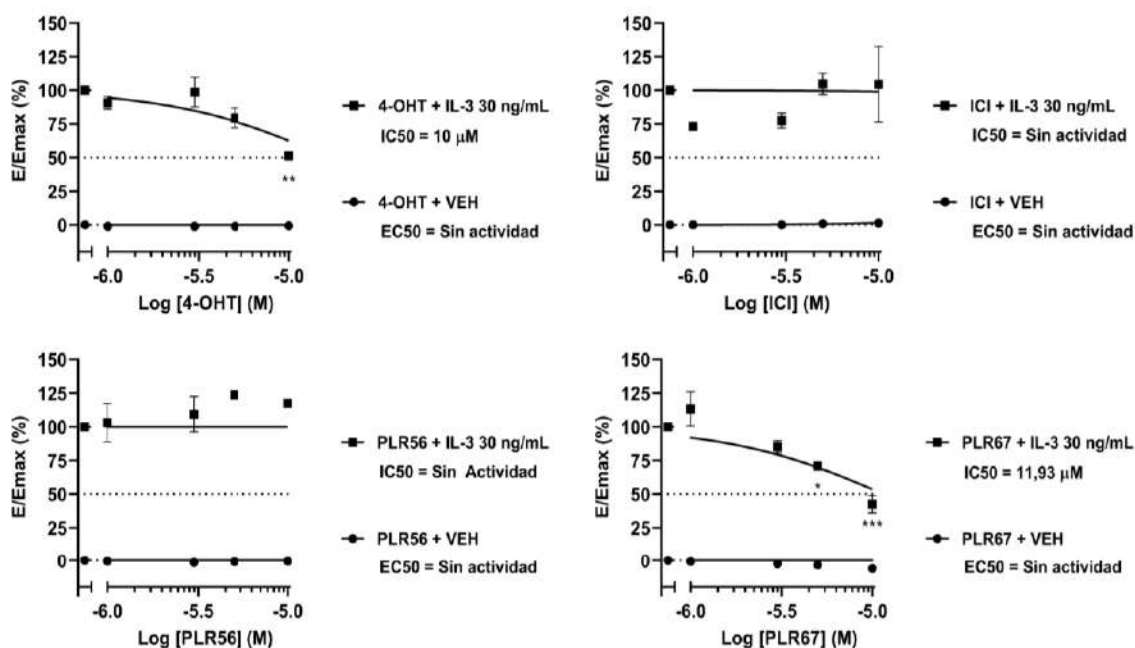


Figura 75. Efectos de los PLRx sobre la transcripción dependiente de STAT3 estimulada por IL-6, del gen reportero de luciferasa en células HEK293. Se representan las gráficas obtenidas para los compuestos 4-OHT, ICI, PLR-56 y PLR-67, representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia (100 %) inducida por la estimulación con IL-6 (10 ng/ml). Las dosis de cada compuesto solo (+VEH) se representan como ● y las dosis actuando en presencia de IL-6 se representan como ■. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a las células estimuladas con IL-6.

Los resultados obtenidos en las células HEK293 revelaron que el PLR-56 inhibió la transcripción dependiente de STAT3 bajo estimulación con IL-6, con un valor promedio de IC50 de 2,36  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, este efecto no fue observado ni para el PLR-67 ni para los fármacos utilizados como controles (ICI y 4-OHT) (**Figura 75**). Contrariamente, ni el PLR-56 ni el fármaco control ICI inhibieron la transcripción dependiente de STAT5 inducida por IL-3 en las células Ba-F3 (**Figura 76**). Sin embargo, tanto PLR-67 como 4-OHT sí que lo hicieron con valores de IC50 de 11,93  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente (**Figura 76**).

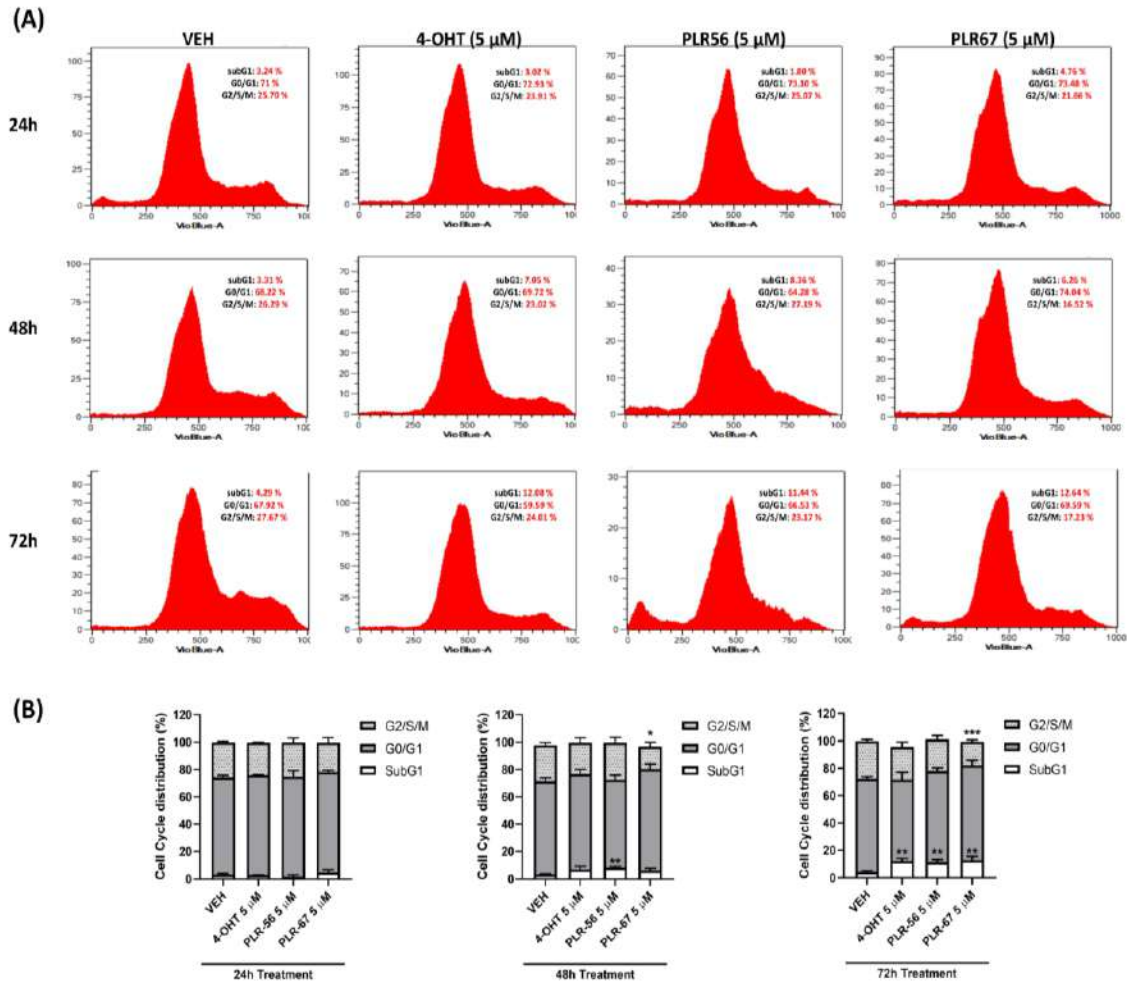


**Figura 76.** Efectos de los PLRx sobre la transcripción dependiente de STAT5 estimulada por IL-3, del gen reportero de luciferasa en células Ba-F3. Se representan las gráficas obtenidas para los compuestos 4-OHT, ICI, PLR-56 y PLR-67, representando el logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la máxima eficacia (100 %) inducida por la estimulación con IL-3 (30 ng/ml). Las dosis de cada compuesto solo (+VEH) se representan como ● y las dosis actuando en presencia de IL-3 se representan como ■. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  respecto a las células estimuladas con IL-3.

## 7. Experimentos para el estudio del ciclo celular en células de cáncer de mama ER+

El estudio de los perfiles del ciclo celular mediante citometría de flujo permitió profundizar en el mecanismo de acción molecular por medio del cual los compuestos de estudio inducían sus efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama ER+. En este *set* de experimentos, se investigaron, inicialmente, los potenciales efectos de los PLR-56 y PLR67, utilizando el fármaco 4-OHT como control, sobre el ciclo celular en células T47D mediante ensayos de dosis (5  $\mu\text{M}$ ) – tiempo (24, 48 y 72 horas) (**Figura 77**).

#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II

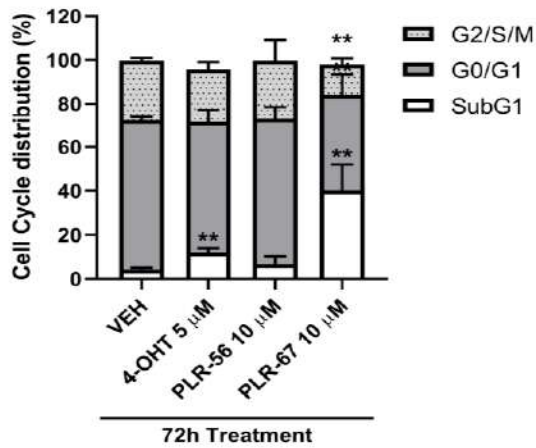


**Figura 77. Estudio dosis-tiempo de los efectos de los compuestos PLRx sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo en células T47D.** Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (5 μM), PLR-56 o PLR-67 (5 μM) durante 24, 48 y 72 horas. En el panel superior (A), se presentan las imágenes representativas de los perfiles de las fases del ciclo celular (subG1, G0/G1 y G2/S/M) obtenidos para las células T47D en los experimentos de citometría de flujo con el equipo MACSQuant 10, tal como se describe en Material y Métodos. En el panel inferior (B), se representan las gráficas obtenidas de la cuantificación del porcentaje de células en cada fase del ciclo para cada tratamiento y tiempo. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada condición de tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  respecto al VEH en cada fase del ciclo celular.

Los resultados de estos experimentos demostraron la ausencia de efectos de los dos compuestos sobre el ciclo tras 24 horas de tratamiento (**Figura 77**). Tanto PLR-56 como PLR-67 y 4-OHT necesitaron de, al menos, 48 horas para empezar a inducir cambios significativos en el ciclo celular, incrementando el porcentaje de células en la fase subG1 de una manera dependiente del tiempo. El producto PLR-67 produjo un incremento concomitante del porcentaje de células en fases G2/S/M a las 48 horas de tratamiento, con respecto a las células tratadas con el VEH (**Figura 77**). A las 72 horas de tratamiento, el incremento del porcentaje de células en fase subG1 inducido por ambos PLRx y por el 4-OHT se hizo más evidente, destacando además el incremento del porcentaje de células en fase G0/G1 y la reducción concomitante del porcentaje de células en las fases G2/S/M, inducida por el PLR-67 (**Figura 77**).



En un segundo *set* de experimentos, se investigó si el efecto de los PLRx sobre el ciclo celular resultaba también dependiente de la dosis. En estos ensayos, las células T47D fueron tratadas durante 72 horas con una dosis de 10  $\mu$ M de ambos PLRx, usando el 4-OHT (5  $\mu$ M) como control (**Figura 78**).



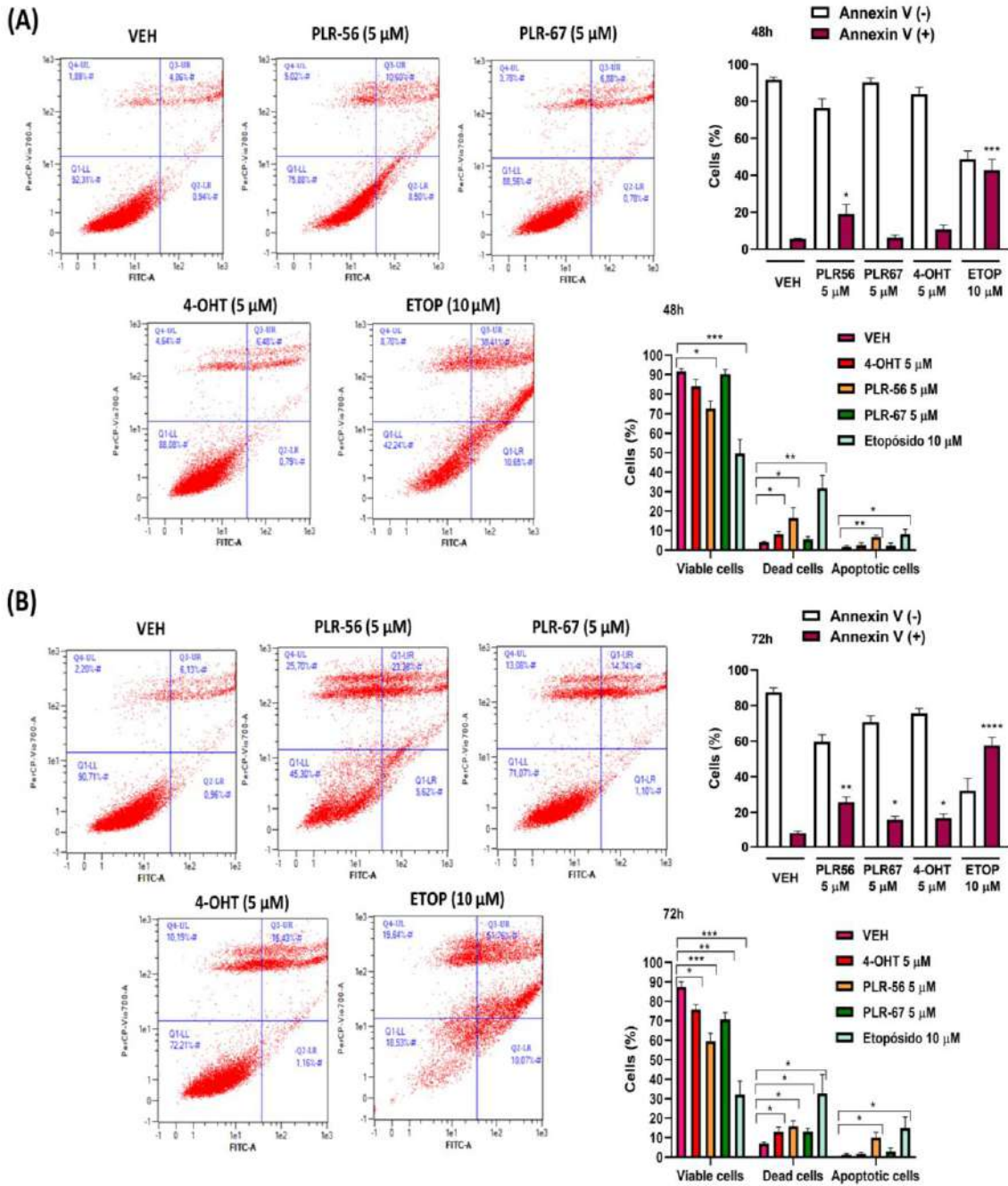
**Figura 78.** Estudio de los efectos de los PLRx sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo en células T47D. Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (5  $\mu$ M), PLR-56 o PLR-67 (ambos a 10  $\mu$ M) durante 72 horas. Se muestran las gráficas obtenidas de la cuantificación de los porcentajes de células en cada fase del ciclo para cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas.  $**p < 0.01$  respecto al VEH en cada fase del ciclo celular.

Los resultados de estos ensayos demostraron que los efectos de los PLRx sobre el ciclo celular eran también dependientes de la dosis. De esta forma, los efectos descritos anteriormente (5  $\mu$ M, 72 horas; **Figura 77**), se vieron intensificados a la dosis de 10  $\mu$ M, especialmente para el PLR-67 (**Figura 78**). Nuevamente, 4-OHT, PLR-56 y PLR-67 produjeron una parada del ciclo celular en la fase subG1. Para el PLR-67, el porcentaje de células en dicha fase fue tan elevado que produjo una reducción concomitante del porcentaje de células en las fases G0/G1 y G2/S/M, generando un perfil de ciclo celular aberrante (**Figura 78**).

## 8. Experimentos para el estudio de la apoptosis en células de cáncer de mama ER+

Tal como se ha expuesto anteriormente, los compuestos PLR-56 y PLR-67 inducen efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama ER+ a través de un mecanismo dependiente del tiempo y de la dosis, que implica el bloqueo del ciclo celular en las fases subG1 y G0/G1, sugiriendo la inducción de muerte celular. Para investigar el mecanismo de muerte de las células tumorales inducido por estos compuestos, se realizaron ensayos de apoptosis (48 y 72 horas de tratamiento; 5  $\mu$ M), utilizando el kit de Anexina V-FITC/Yoduro de propidio (PI) y etopósido (ETOP) como fármaco control inductor de apoptosis, tal como se describe en Material y Métodos. Estos ensayos permitieron detectar poblaciones celulares Anexina V negativas (Anexina V (-); células vivas) y Anexina V positivas (Anexina V (+); células en apoptosis temprana, apoptosis tardía, necrosis y células muertas de manera inespecífica) (**Figura 79**).

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



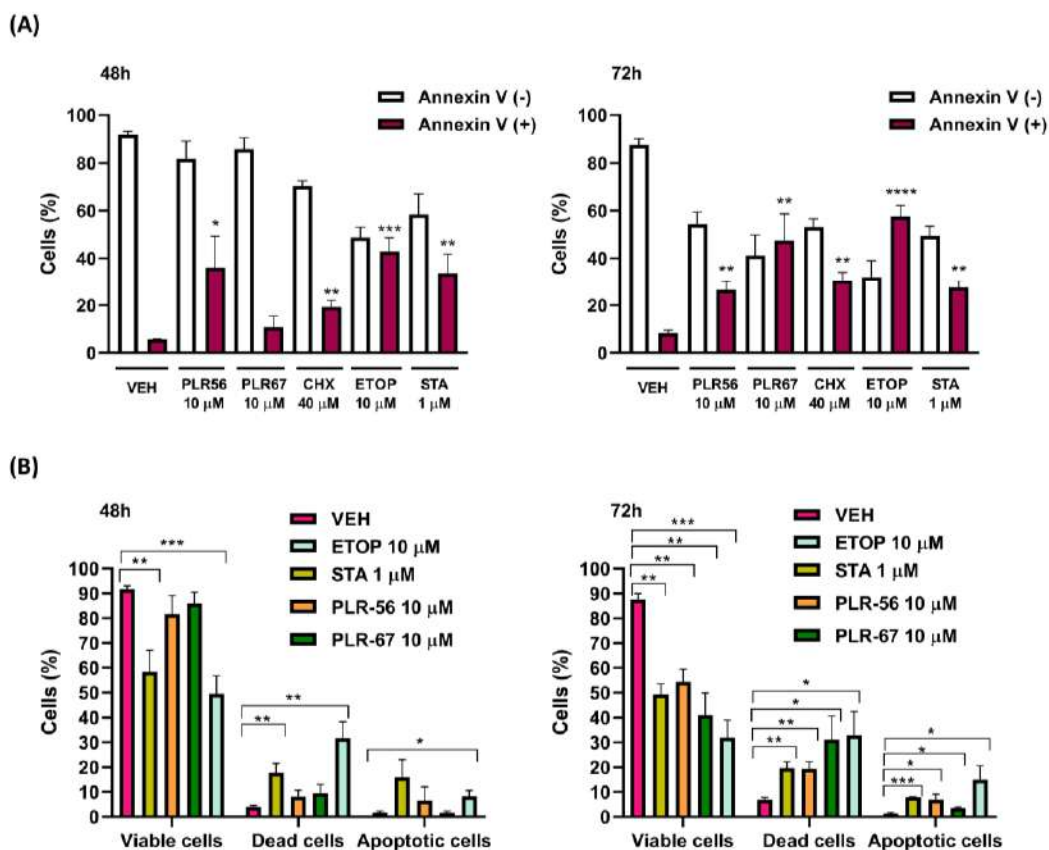
**Figura 79.** Estudio de los efectos de los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la inducción de apoptosis en células T47D determinada por citometría de flujo (Anexina V-FITC/Yoduro de propidio (PI)). Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), ETOP (10 μM), 4-OHT; 5 μM, PLR-56 o PLR-67 (5 μM) durante (A) 48 o (B) 72 horas. En ambos paneles izquierdos, se presentan diagramas representativos de cada tratamiento obtenido con el citómetro MACSQuant 10, tal como se describe en Material y Métodos. En ellos los eventos se dividieron en función de la existencia o no de translocación de la fosfatidilserina a la superficie de las células y de la integridad de la membrana celular. Esto permitió diferenciar células viables (cuadrante inferior izquierdo, Q1-LL), células en apoptosis temprana (cuadrante inferior derecho, Q2-LR) y células en fase de muerte avanzada (cuadrante superior derecho, Q3-UR). En los paneles derechos, se representan las gráficas obtenidas de la cuantificación de los porcentajes de células Anexina V (-) (viables) con respecto a aquellas células Anexina V (+) (células apoptóticas) para cada tratamiento y tiempo. Además, se representan las gráficas de los porcentajes de células viables, muertas y apoptóticas tras 48 y 72 horas de tratamiento. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento para células viables, muertas o apoptóticas mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto al porcentaje de células tratadas con el VEH de cada tiempo concreto.

Los resultados obtenidos en estos ensayos demostraron que ambos PLRx incrementaron significativamente el porcentaje de células Anexina V (+) de una manera dependiente del tiempo, comenzando a detectarse este efecto a las 48 horas (**Figura 79A**) y, haciéndose más evidente a las 72 horas de tratamiento (**Figura 79B**). Además, ambos productos produjeron un incremento concomitante en el porcentaje de células que se encontraban en apoptosis temprana y en muerte celular avanzada (**Figura 79**). Los fármacos utilizados como controles (4-OHT y ETOP) también aumentaron el porcentaje de células Anexina V (+) desde las 48 horas de tratamiento (**Figura 79A**), siendo este efecto más evidente a las 72 horas (**Figura 79B**).

La división de las células Anexina V (+) en dos grupos (células en apoptosis temprana, Anexina V (+) PI(-) y células en muerte celular avanzada, Anexina V (+) PI (+)), permitió profundizar en el mecanismo de muerte celular generado por los PLRx y controles a los tiempos estudiados (**Figura 79**). En línea con los resultados descritos anteriormente, todos los fármacos ensayados produjeron una reducción evidente del porcentaje de células vivas y un incremento de células muertas y apoptóticas tras 48 horas de tratamiento, siendo este efecto estadísticamente significativo para el PLR-56 y ETOP respecto al VEH (**Figura 79A**). Estos efectos fueron estadísticamente significativos para todos los productos estudiados tras 72 horas de tratamiento (**Figura 79B**). Cabe destacar que 4-OHT y PLR-67 parecieron inducir una muerte celular avanzada y no en forma de apoptosis temprana, tal y como evidenció la ausencia de diferencias significativas en el grupo de células apoptóticas con respecto a las células tratadas con el VEH (**Figura 79**).

Finalmente, el aumento de la dosis de ambos PLRx a 10  $\mu$ M produjo resultados muy similares a los observados para la dosis de 5  $\mu$ M (**Figura 80**). En este segundo *set* de experimentos se utilizaron ETOP, cicloheximida (CHX) y estaurosporina (STA) como controles positivos de apoptosis (**Figura 80**).





**Figura 80.** Estudio de los efectos de los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la inducción de apoptosis en células T47D determinada por citometría de flujo (Anexina V-FITC/Yoduro de propidio (PI)). Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), CHX (40  $\mu$ M), STA (1  $\mu$ M), ETOP (10  $\mu$ M), PLR-56 o PLR-67 (10  $\mu$ M) durante 48 o 72 horas. En el panel (A), se muestran las gráficas obtenidas de la cuantificación de los % de células Anexina (-) (viables), respecto a células Anexina (+) (células apoptóticas) para cada tratamiento y tiempo. En el panel (B), se presentan las gráficas obtenidas de la cuantificación del porcentaje de células viables, células en fase de muerte avanzada y células en apoptosis temprana para cada tratamiento y tiempo. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento para células viables, muertas o apoptóticas mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto al porcentaje de células tratadas con el VEH de cada tiempo concreto.

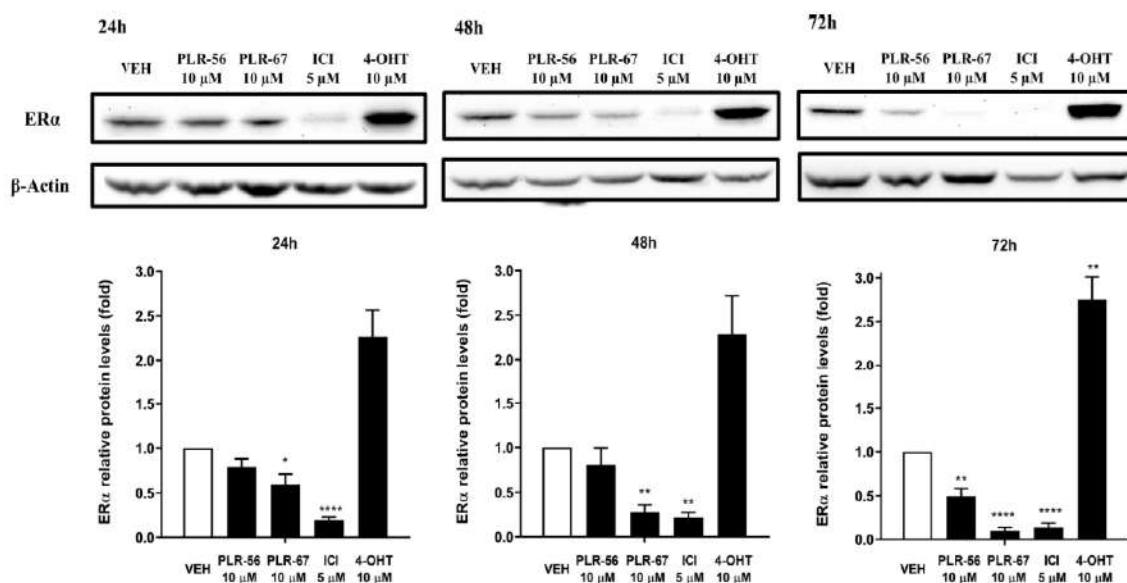
## 9. Regulación de la expresión proteica de ER $\alpha$ en células de cáncer de mama ER+

### 9.1. Evaluación de la expresión proteica de ER $\alpha$ en experimentos de *Western blot*

El principal rasgo fisiopatológico de las células de cáncer de mama ER+ es, precisamente, la expresión de los ER, concretamente de la isoforma clásica del ER $\alpha$  de 66 kDa, que actúa como una proteína que orquesta el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia tumoral (39). Por ello, se quiso analizar el posible efecto modulador de los PLRx líderes sobre la expresión proteica del ER $\alpha$ . Para abordar experimentalmente este objetivo, se realizaron ensayos de inmunodetección por *Western blot* (WB) del ER $\alpha$  en extractos proteicos totales obtenidos de células T47D tratadas con PLR-56 (10  $\mu$ M), PLR-67 (10  $\mu$ M), 4-OHT (10  $\mu$ M) o ICI (5  $\mu$ M) durante 24, 48 o 72 horas (Figura 81).

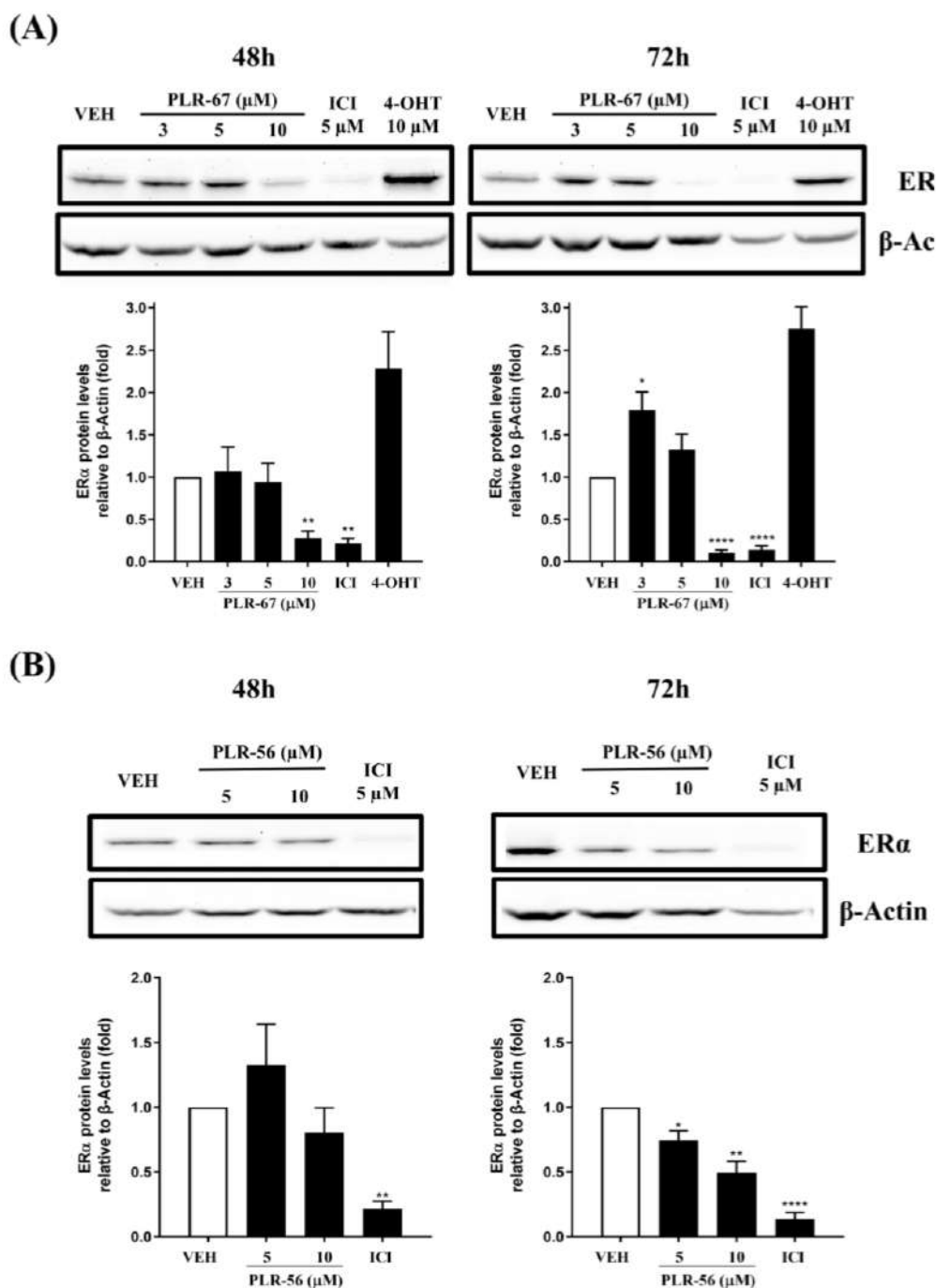


#### IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



**Figura 81.** Efectos de los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la expresión proteica de ERα determinada mediante ensayos de inmunodetección dosis-tiempo en células T47D. Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (10 μM), ICI (5 μM), PLR-56 o PLR-67 (10 μM) durante 24, 48 o 72 horas. Finalizados los diferentes tratamientos, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron usados en ensayos de inmunodetección (*Western blot*, WB) realizados con anticuerpos específicos, tal como se describe en Material y Métodos. La proteína β-actina fue utilizada como control de carga de los experimentos. En el panel superior se muestran imágenes de WB representativas para ERα y β-Actina. En el panel inferior se representan los resultados (media ± error estándar de la media (SEM)) de la cuantificación densitométrica de las bandas en términos de expresión relativa de ERα para cada tratamiento con respecto a la expresión observada en las células tratadas con VEH. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a los niveles de expresión proteica observados en las células tratadas con VEH en cada tiempo concreto.

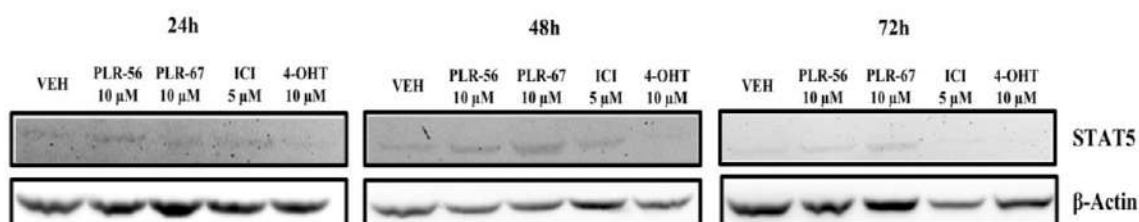
Tal como cabría esperar por los datos previamente publicados (110,218,219), los resultados de estos ensayos mostraron que el fármaco control ICI redujo significativamente la cantidad de proteína total de ERα a partir de las 3 horas de tratamiento (datos no mostrados), manteniendo este efecto hasta las 72 horas (**Figura 81**). También, como cabría esperar, el 4-OHT no solo no redujo la expresión del ERα, sino que contribuyó a su estabilización (218), lo que se manifestó en un incremento de la cantidad de la proteína, con respecto a las células tratadas con el VEH a todos los tiempos estudiados (**Figura 81**). De manera interesante, el producto PLR-67 inhibió significativamente la expresión proteica del ERα desde las 24 horas de tratamiento, incrementándose este efecto con el paso del tiempo hasta las 72 horas. Sin embargo, el compuesto PLR-56 requirió de, al menos, 72 horas para reducir significativamente la cantidad total del ERα (**Figura 81**). Teniendo en cuenta estos resultados, se diseñó un segundo *set* de experimentos de WB en los que se investigó si la inhibición de la expresión proteica del ERα inducida por los PLRx se producía de una manera dependiente de la dosis, además del tiempo. Para ello, las células T47D fueron tratadas durante 48 y 72 horas con diferentes dosis de cada PLRx (3, 5 y 10 μM para PLR-67, **Figura 82A**; y 5 y 10 μM para el PLR-56, **Figura 82B**), utilizando de nuevo al 4-OHT (10 μM) e ICI (5 μM) como controles (**Figura 82**).



**Figura 82.** Efectos de los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la expresión proteica de ER $\alpha$  determinada mediante ensayos de inmunodetección dosis-respuesta en células T47D. Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (10  $\mu\text{M}$ ), ICI (5  $\mu\text{M}$ ), (A) PLR-67 (3–10  $\mu\text{M}$ ) o (B) PLR-56 (5–10  $\mu\text{M}$ ) durante 48 o 72 horas. Finalizados los diferentes tratamientos, se obtuvieron extractos proteicos totales que fueron usados en ensayos de inmunodetección (*Western blot*, WB) realizados con anticuerpos específicos, tal como se describe en Material y Métodos. La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga de los experimentos. En la parte superior de los paneles A y B se muestran imágenes de WB representativas para ER $\alpha$  y  $\beta$ -Actina en el tratamiento respectivo con el PLR-67 o PLR-56 durante 48 y 72 horas. En la parte inferior de ambos paneles se representan los resultados (media  $\pm$  error estándar de la media (SEM)) de la cuantificación densitométrica de las bandas en términos de expresión relativa de ER $\alpha$  para cada tratamiento con respecto a la expresión observada en las células tratadas con VEH. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$  con respecto a los niveles de expresión proteica observados en las células tratadas con VEH en cada tiempo concreto.

Los resultados de estos ensayos pusieron de manifiesto que el efecto inhibitor de la expresión proteica del ER $\alpha$  inducido por el PLR-67 depende de la dosis (10  $\mu$ M) y del tiempo, puesto que se observó un mayor efecto cuando las células fueron tratadas durante 48 y 72 horas (**Figuras 81 y 82A**). Sin embargo, el compuesto PLR-56 redujo significativamente la cantidad de ER $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis (5 y 10  $\mu$ M) tras 72 horas de tratamiento y no a las 48 horas (**Figuras 81 y 82B**). Los controles 4-OHT e ICI se comportaron de igual forma que en los ensayos de WB de dosis-tiempo (**Figuras 81 y 82**).

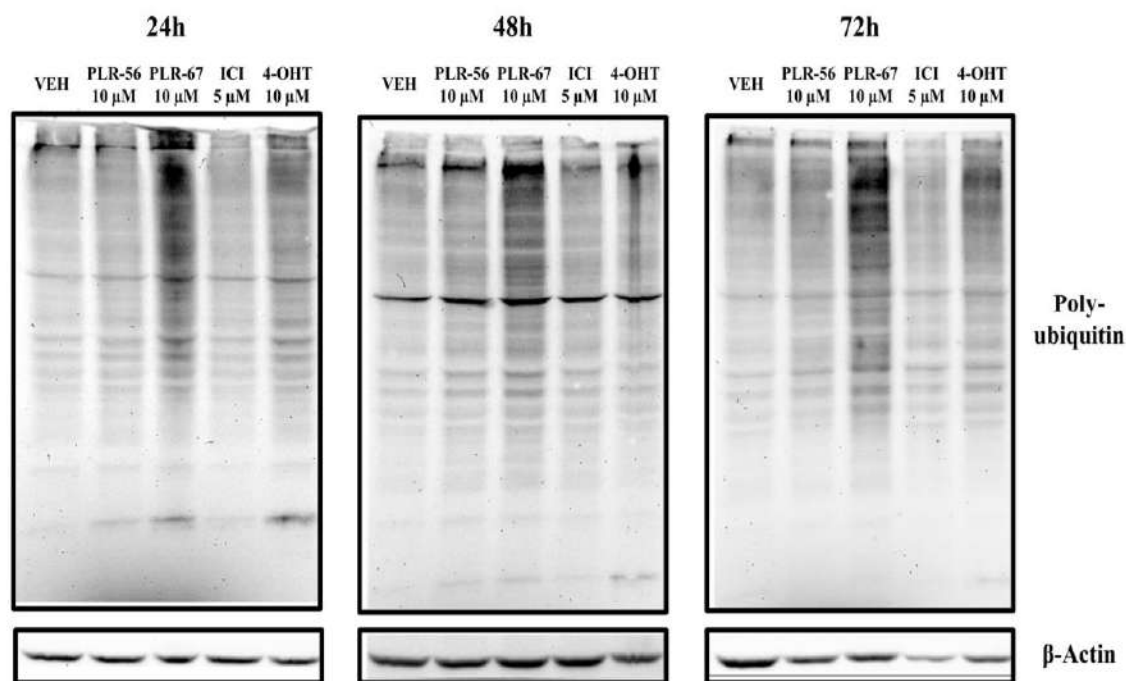
En paralelo al estudio de la expresión proteica de ER $\alpha$  y como control de la especificidad de los efectos de los PLRx, se investigó si estos compuestos modificaban la expresión proteica de otro factor de transcripción como es STAT5, en las células T47D. Para ello, se realizaron experimentos de dosis (10  $\mu$ M para PLR-56, PLR-67 y 4-OHT; 5  $\mu$ M para ICI) – tiempo (24, 48 y 72 horas) que permitieron la obtención de extractos proteicos totales que fueron utilizados para determinar la expresión proteica de STAT5 total mediante WB (**Figura 83**).



**Figura 83.** Estudio dosis-tiempo de los efectos de los PLRx sobre la expresión proteica de STAT5 total determinada mediante ensayos de *Western blot* en células T47D. Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (10  $\mu$ M), ICI (5  $\mu$ M), PLR-56 o PLR-67 (ambos a 10  $\mu$ M) durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, se prepararon extractos proteicos totales que fueron utilizados en ensayos de inmunodetección para determinar la expresión proteica de STAT5 total. La expresión proteica de la proteína  $\beta$ -actina fue usada como control de carga de estos ensayos.

Estos ensayos demostraron que ninguno de los PLRx alteró la expresión proteica de STAT5 total (**Figura 83**). Sin embargo, en lo que se refiere a los fármacos usados como controles, el 4-OHT pareció reducir la cantidad de STAT5 total a partir de las 24 horas de tratamiento y hasta las 72 horas, mientras que el ICI necesitó 72 horas de tratamiento para producir al menos parcialmente, el mismo efecto (**Figura 83**).

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el que los PLRx reducían la expresión proteica del ER $\alpha$ , se procedió a estudiar los niveles de proteínas poliubiquitinadas mediante ensayos de WB (**Figura 84**), puesto que el “*turnover*” de esta proteína está mediado por su ubiquitinación y posterior degradación proteasómica (38).



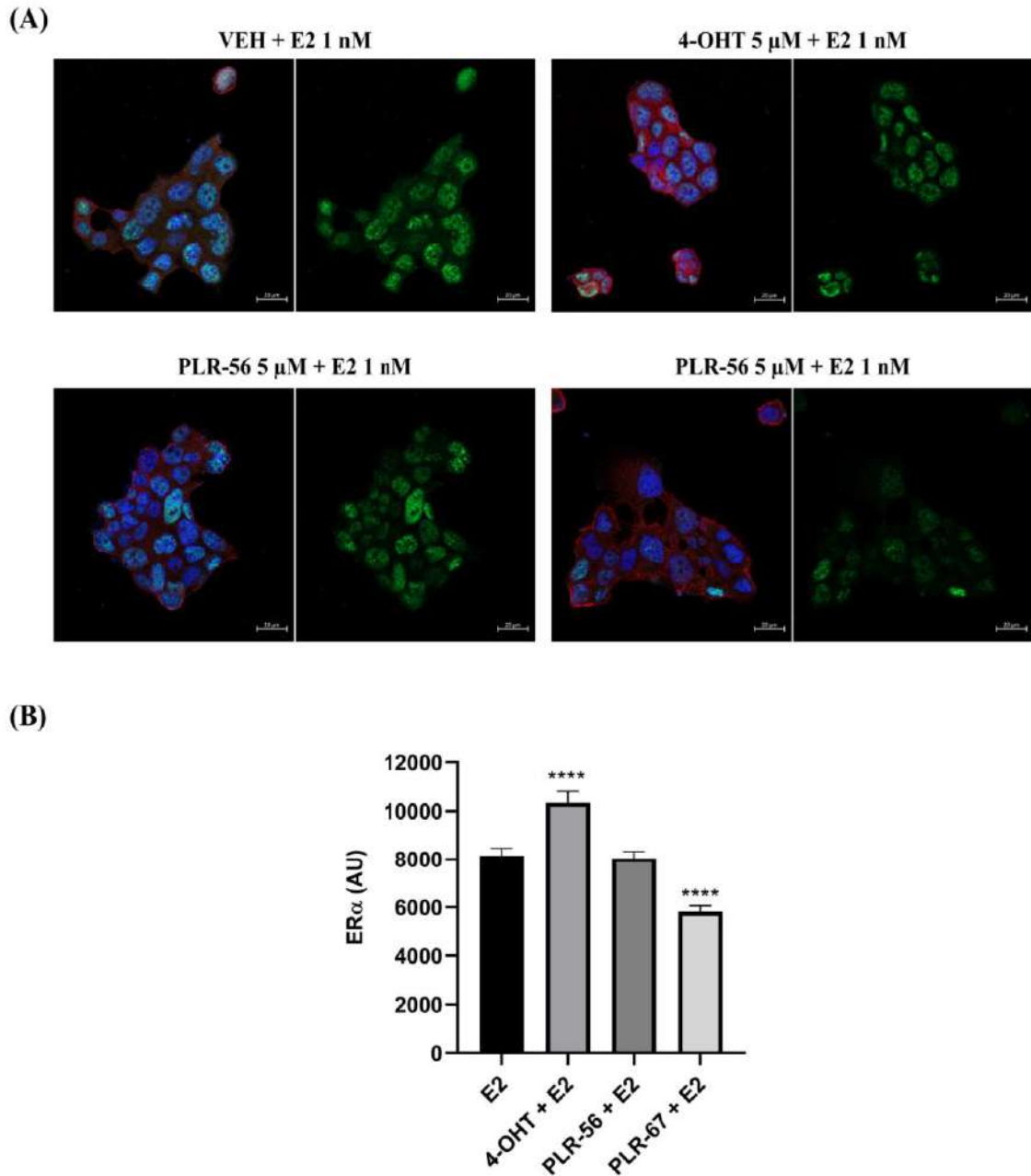
**Figura 84.** Estudio dosis-tiempo de los efectos de los PLRx sobre los niveles de proteínas poliubiquitinadas, determinados mediante *Western blot* en células T47D. Las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (10 μM), ICI (5 μM), PLR-56 o PLR-67 (ambos a 10 μM) durante 24, 48 o 72 horas. Posteriormente, se prepararon extractos proteicos totales que fueron utilizados en ensayos de inmunodetección para determinar los niveles de proteínas poliubiquitinadas. La expresión proteica de la proteína β-actina fue usada como control de carga de estos ensayos.

El producto PLR-67 (10 μM) produjo un incremento evidente de la cantidad de proteínas poliubiquitinadas a todos los tiempos estudiados con respecto a las células tratadas con VEH (**Figura 84**). Además, el 4-OHT incrementó discretamente el nivel de estas proteínas a todos los tiempos estudiados con respecto a las células tratadas con VEH, mientras que PLR-56 e ICI no produjeron este efecto (**Figura 84**).

## 9.2. Evaluación de la expresión proteica de ERα en experimentos de Microscopía Confocal

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de WB, a continuación, se procedió a investigar si los PLRx producían cambios en la localización subcelular del ERα mediante ensayos de inmunofluorescencia por microscopía confocal en células de cáncer de mama ER+. Para ello, las células T47D fueron preincubadas durante 24 horas en presencia o ausencia de los PLRx o 4-OHT para luego ser estimuladas con E2 (1 nM) durante 30 minutos (**Figura 85**).





**Figura 85.** Estudio del efecto de los PLRx sobre la localización subcelular del ER $\alpha$  determinada mediante ensayos de inmunofluorescencia y analizados por microscopía confocal en células T47D. Las células fueron preincubadas durante 24 horas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (5  $\mu$ M), PLR-56 o PLR-67 (ambos a 5  $\mu$ M), antes de someterlas a un tratamiento de 30 minutos con E2 (1 nM). Posteriormente, las células fueron fijadas, permeabilizadas e incubadas con anticuerpos específicos dirigidos contra el ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -F10; tinción en color verde),  $\beta$ -catenina (marcador de membranas; tinción en color rojo) y DAPI (marcador del ADN; tinción nuclear azul). En el panel (A), se presentan imágenes representativas de cada tratamiento capturadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 800+ con el *merge* de los tres canales de fluorescencia y con el canal de fluorescencia verde, tal como se describe en Material y Métodos. En el panel (B), se representan gráficamente los valores obtenidos de la cuantificación de la señal fluorescente verde obtenida para la expresión del ER $\alpha$  nuclear en cada una de las condiciones de tratamiento, tal como se describe en Material y Métodos. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a los niveles de expresión proteica relativa del ER $\alpha$  obtenidos en las células no preincubadas y estimuladas con E2 a 1 nM.

El ER $\alpha$  mostró una presencia eminentemente intracelular, con un mayor nivel de localización nuclear en las células estimuladas con E2 en ausencia de los compuestos de estudio (**Figura 85**). Sin embargo, en las células preincubadas con los PLRx y estimuladas posteriormente con E2, se observó que el 4-OHT incrementó la presencia nuclear del ER $\alpha$ , el PLR-56 no afectó a la localización subcelular del receptor y que el PLR-67 redujo significativamente la localización nuclear y citoplasmática (inhibiendo significativamente la expresión proteica) del ER $\alpha$  con respecto a las células tratadas con E2 (**Figura 85**).

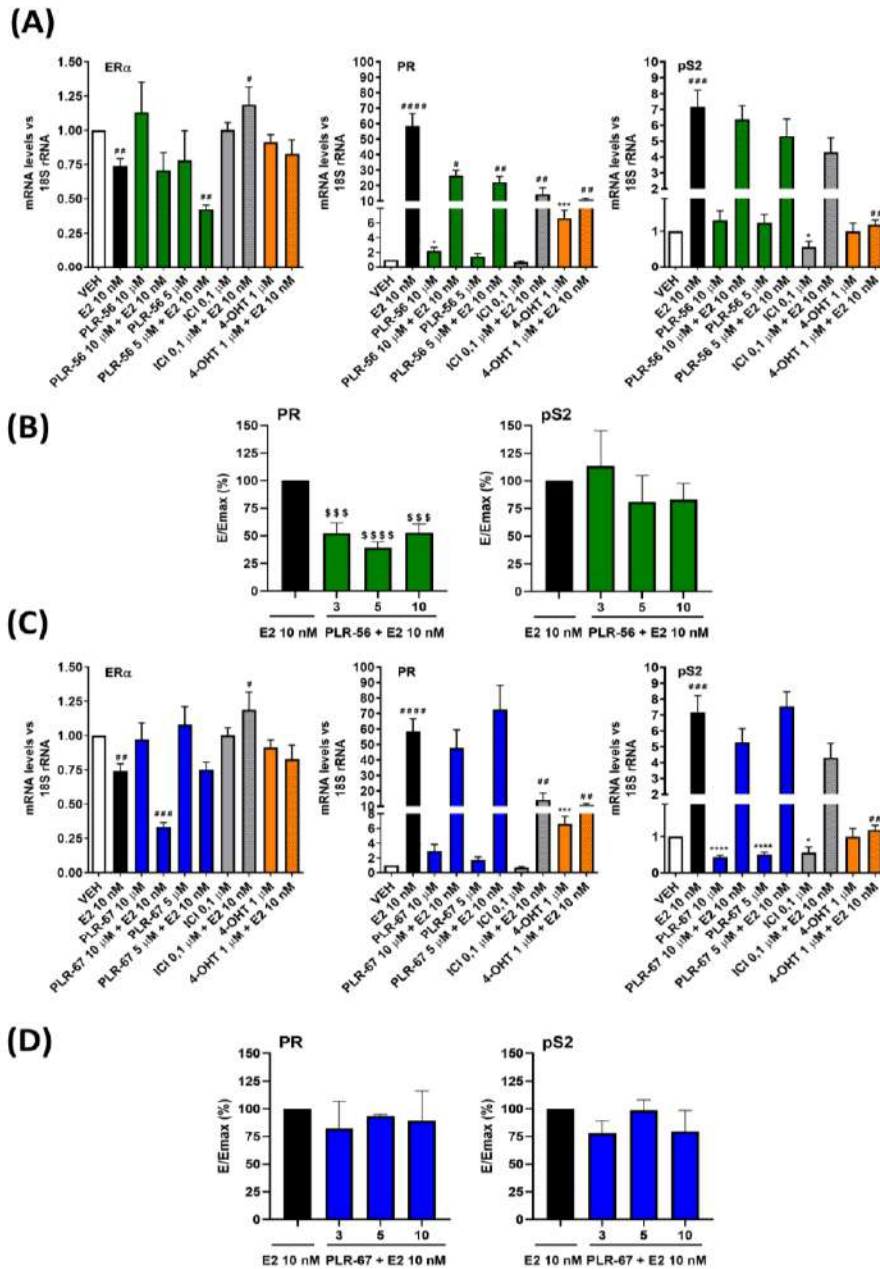
## 10. Regulación de la expresión de genes dependientes del ER en células de cáncer de mama ER+

Para investigar si la inhibición de la expresión proteica del ER $\alpha$  inducida por los compuestos PLR-56 y PLR-67 provocaba también una modulación de la expresión génica, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR) en los que se utilizaron pares de cebadores (*primers*) que amplificaron los genes *ER $\alpha$* , *PR* y *pS2*, cuya transcripción depende específicamente del ER. En estos ensayos, las células MCF-7 fueron deprivadas de estrógenos y tratadas durante 24 horas con los productos PLR-56, PLR-67, 4-OHT o ICI o preincubadas durante 3 horas con estos compuestos, manteniendo los tratamientos durante 24 horas en presencia de E2 (10 nM) (**Figura 86**).

El E2 disminuyó la expresión del gen *ER $\alpha$*  (0,25 veces) e incrementó la de *PR* (60 veces) y *pS2* (7 veces) con respecto a las células no tratadas (VEH) (**Figura 86**). Los fármacos control ICI y 4-OHT no alteraron la expresión del *ER $\alpha$*  ni de *pS2* en ausencia de E2, mientras que inhibieron levemente la expresión de ambos genes en su presencia, con respecto al nivel de expresión observado en las células tratadas con E2. Además, ambos fármacos redujeron significativamente la expresión de *PR* (15–20 veces) en presencia de E2 (**Figura 86**). Sin embargo, cabe destacar que el 4-OHT incrementó la expresión de *PR* (6,6 veces) en ausencia de E2, con respecto al nivel de expresión observado en las células tratadas con el VEH (**Figura 86**).

Los resultados de los ensayos de q-RT-PCR mostraron que el PLR-56 no moduló la expresión de *ER $\alpha$*  ni de *pS2* en ausencia de E2, pero tampoco en presencia de la hormona (**Figura 86A y 86B**). Este producto sí inhibió marcadamente la expresión génica del *PR* inducida por el agonista a todas las dosis ensayadas (**Figura 86B**). Por su parte, el PLR-67 redujo la expresión del *ER $\alpha$*  inducida por el E2 (**Figura 86A**), no alteró los niveles del ARNm del *PR* ni en ausencia ni presencia de E2 y disminuyó los niveles del ARNm de *pS2* en ausencia de la hormona (**Figura 86C y 86D**).

IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



**Figura 86.** Estudio de los efectos de los PLRx sobre la expresión génica de *ERα*, *PR* y *pS2* medida en ensayos de q-RT-PCR en células MCF-7. Las células fueron privadas de estrógenos durante 5 días y sembradas en medio 5 % DCC-FBS antes de ser sometidas a tratamiento. Posteriormente, las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (1 μM), (A)–(B) PLR-56 o (C)–(D) PLR-67 (ambos entre 3–10 μM) durante 24 horas o fueron preincubadas durante 3h con los mencionados productos antes de la estimulación con E2 (10 nM), manteniendo estos tratamientos durante 24h. La modulación de la expresión génica se estudió por PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR) usando el gen *18S* como *housekeeping* para la normalización. En los paneles (A) y (C) se presentan los datos del PLR-56 y PLR-67, respectivamente, como valores de media ± error estándar de la media (SEM) de la expresión transcripcional relativa de cada gen respecto al gen *18S*, normalizando a su vez respecto a la expresión basal del vehículo, calculada para al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a los niveles de expresión génica del VEH; # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$ , respecto a los niveles de expresión génica de los productos actuando en presencia de E2. En los paneles (B) y (D), correspondientes al tratamiento respectivo de PLR-56 y PLR-67 en combinación con E2, se muestran dos gráficas de barras para los genes *PR* y *pS2*, en las que se presentan los valores E/Emax (%) para cada tratamiento, calculado a partir de la máxima eficacia (100 %) obtenida para el E2. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni. \$\$\$ $p < 0.001$ ; \$\$\$\$ $p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con E2.

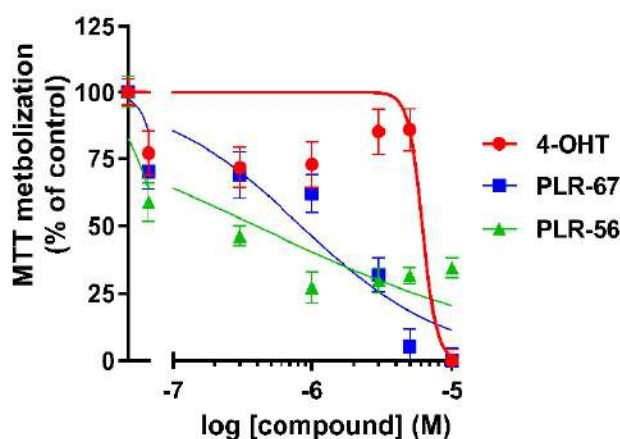


## 11. Experimentos de validación de los PLRx líderes en células de cáncer de endometrio ER+

El estudio de compuestos antitumorales con propiedades antiestrogénicas en cáncer de mama ER+ requiere de la validación de sus efectos sobre el endometrio. El fármaco 4-OHT, aunque actúa como antagonista en mama, presenta efectos uterotróficos agonistas, lo que supone un desafío clínico de enorme relevancia (90,98). Para la validación de los efectos antitumorales de los PLRx explorados en mama, se diseñaron una serie de experimentos en células Ishikawa (adenocarcinoma uterino ER+) (206,207).

### 11.1. Ensayos de viabilidad celular en células de cáncer de endometrio ER+

Inicialmente, se investigaron los potenciales efectos de los PLRx sobre la viabilidad de las células Ishikawa mediante ensayos de MTT dosis-respuesta, utilizando el 4-OHT como control. Los resultados mostraron un potente efecto antitumoral de ambos PLRx sobre estas células con respecto al 4-OHT, con valores de IC<sub>50</sub> de  $0,27 \pm 0,09 \mu\text{M}$ ,  $1,29 \pm 0,38 \mu\text{M}$  y  $6,16 \pm 0,80 \mu\text{M}$  para PLR-56, PLR-67 y 4-OHT, respectivamente (Figura 87).



**Figura 87.** Evaluación de los efectos de los productos PLR-56 y PLR-67 sobre la viabilidad de células Ishikawa. Representación de la inhibición de la viabilidad celular en experimentos de MTT tras 72 horas de tratamiento con los compuestos (PLR-56, PLR-67 o 4-OHT) en medio completo. Se calculó un valor medio de IC<sub>50</sub> para cada producto a partir de las réplicas experimentales (al menos 3 experimentos independientes). Las dosis de compuesto evaluadas (0,1–10  $\mu\text{M}$ ) se representan como: ● para 4-OHT, ▲ para PLR-56 y ■ para PLR-67.

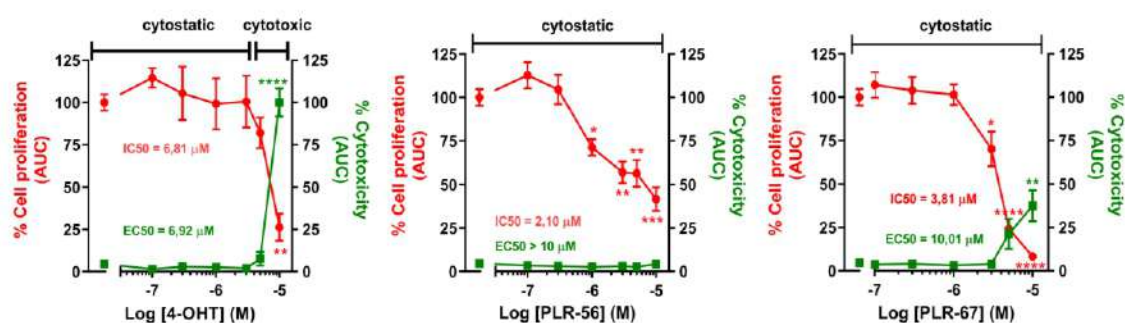
### 11.2. Ensayos de proliferación en células de cáncer de endometrio ER+

#### 11.2.1. Ensayos de proliferación en medio completo

Paralelamente, se estudió el efecto de ambos PLRx sobre el crecimiento de células Ishikawa a lo largo del tiempo, en términos de proliferación y citotoxicidad mediante el uso del sistema Incucyte™ HD ZOOM (Figura 88). Se determinaron potencias antitumorales mayores a las registradas en los experimentos de MTT (Figura 87), con dosis inhibitorias estadísticamente



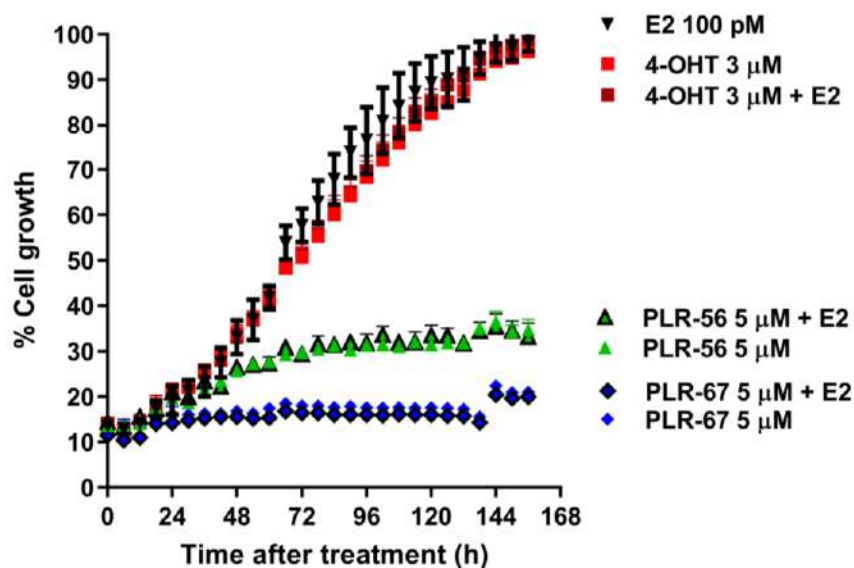
significativas para el PLR-56 (1–10  $\mu\text{M}$ ) y para el PLR-67 (3–10  $\mu\text{M}$ ), en relación con las células no tratadas (VEH) (**Figura 88**). Por lo general, ambos PLRx se comportaron como citostáticos, contrastando de esta manera con el efecto citotóxico del 4-OHT, capaz de inhibir significativamente la proliferación a su dosis más elevada (10  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 88**). Solamente, la dosis más elevada del PLR-67 (10  $\mu\text{M}$ ) incrementó significativamente la citotoxicidad (~ 35–40 %), en comparación con el valor de citotoxicidad basal del VEH (**Figura 88**).



**Figura 88.** Efectos de los compuestos sobre la proliferación y la citotoxicidad de células Ishikawa en medio completo. Representación de las gráficas del área bajo la curva (AUC) en términos de confluencia o proliferación en contraste de fases (eje Y izquierdo) y confluencia fluorescente verde o citotoxicidad (eje Y derecho) de los productos (PLR-56, PLR-67 y 4-OHT) en células Ishikawa. Las células se trataron con VEH (0,05 % DMSO) o diferentes dosis de compuestos (0,01–10  $\mu\text{M}$ ) durante 5 días en condiciones de medio completo. Se representan los valores medios  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de confluencia y citotoxicidad, para cada dosis a tiempo final, comparando respecto al máximo crecimiento celular en presencia de VEH y de la máxima citotoxicidad inducida por el 4-OHT a 10  $\mu\text{M}$ . El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a las células no tratadas (VEH).

### 11.2.2. Ensayos de proliferación en medio desprovisto de estrógenos

Con el objetivo de analizar los efectos estro/antiestrogénicos específicos de los PLRx sobre la proliferación de las células tumorales del endometrio, estas se cultivaron en medio privado de estrógenos y los efectos de los productos sobre el crecimiento celular se monitorizaron con el sistema Incucyte™ HD ZOOM. De manera relevante, los productos PLR-56 y PLR-67 mantuvieron su efecto antagonista en células Ishikawa en condiciones libres de estrógenos, tanto en presencia como en ausencia de E2 (0,1 nM). A diferencia de ellos, el 4-OHT (3  $\mu\text{M}$ ) mostró una acción agonista del ER en estas células, confirmando su efecto uterotrófico ya descrito (54,90,98), y alcanzando un índice de crecimiento similar al detectado con E2 (**Figura 89**).

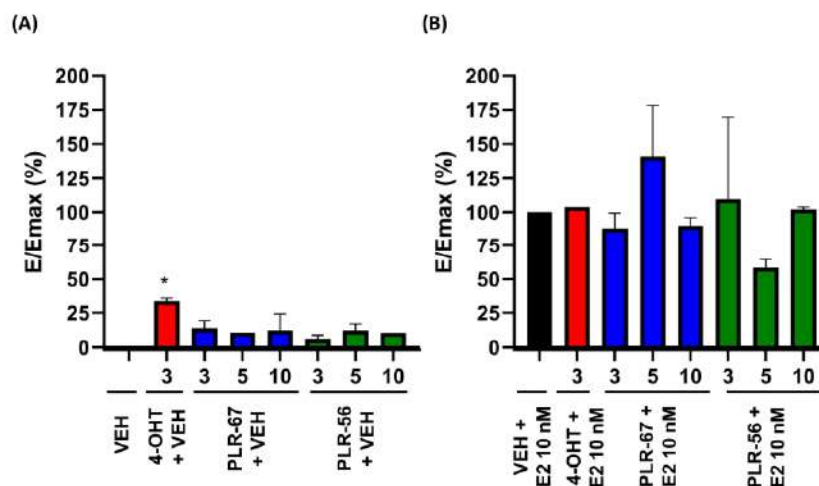


**Figura 89.** Representación de los efectos de los PLRx sobre la proliferación inducida por E2 en células Ishikawa en medio privado de estrógenos. Las células Ishikawa se trataron con VEH (0,05 % de DMSO), 4-OHT (3 μM) o compuestos (5 μM) en ausencia (+VEH) o presencia de E2 (0,1 nM) durante 7 días en condiciones de privación estrogénica (0.5 % de DCC-FBS), tras lavados previos durante 7 días (10 % de DCC-FBS). Se representó la cinética de crecimiento celular a partir de las réplicas experimentales del porcentaje de confluencia (crecimiento celular) para los compuestos actuando solos (+VEH) o en presencia de E2 (0,1 nM).

### 11.3. Evaluación de la actividad enzimática fosfatasa alcalina en células de cáncer de endometrio ER+

Puesto que la enzima fosfatasa alcalina (ALP) se encuentra directa y estrictamente regulada por la activación del ER (206,207), se estudió si el antagonismo observado sobre la proliferación de las células Ishikawa estaba correlacionado con un efecto inhibitorio de la actividad ALP por parte de los PLRx. Para ello, las células Ishikawa privadas de estrógenos se trataron con los compuestos solos (+VEH) y en combinación con E2 (10 nM) durante 24 horas y se midió la actividad ALP (**Figura 90**).

Los productos PLR-56 y PLR-67 no mostraron actividad agonista significativa a las dosis ensayadas, a diferencia del 4-OHT cuyos efectos estrogénicos (25%) se observaron tras 24 horas de tratamiento. Tampoco se observó una inhibición de la actividad ALP inducida por E2 por parte de los PLRx tras 24 horas de tratamiento (**Figura 90**).

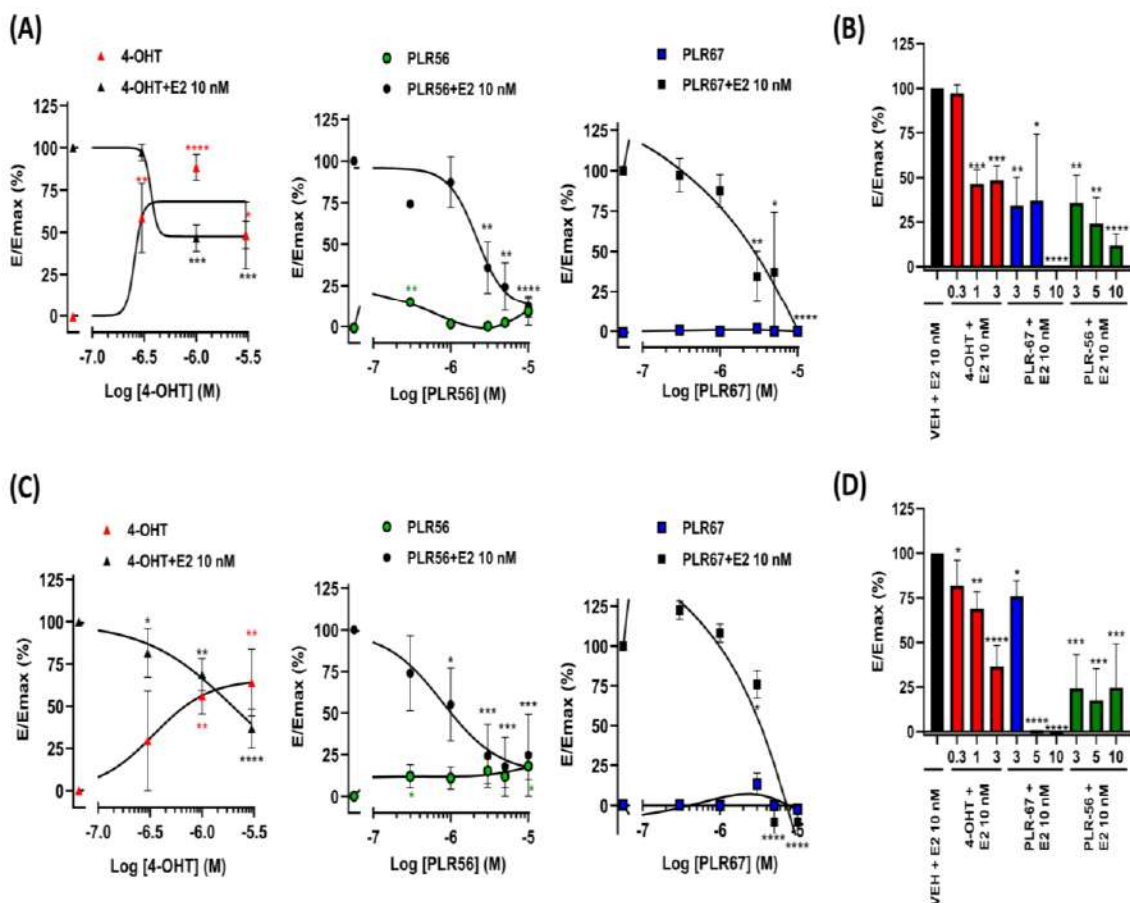


**Figura 90. Evaluación de la actividad estro- y antiestrogénica de los PLRx sobre la actividad enzimática fosfatasa alcalina (ALP) inducida por E2 en células Ishikawa.** Las células Ishikawa fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO), 4-OHT (3 μM) o compuestos (3–10 μM) durante 24 horas: **(A)** en ausencia (+VEH) o **(B)** en presencia de E2 (10 nM) en condiciones de deprivación estrogénica (0.5 % DCC-FBS), tras lavados previos durante 1 semana (10 % de DCC-FBS). Se representa en diagrama de barras, la eficacia, E/Emax (%), calculada a partir de la Emax exhibida por el E2. La E/Emax (%) de las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se compararon respecto a la eficacia basal detectada para el VEH y la eficacia de las dosis de producto actuando en presencia de E2 se compararon con respecto a la E/Emax (%) del E2. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$  para las dosis de compuesto actuando sin E2 respecto a las células no tratadas (VEH).

Posteriormente, en otra tanda de ensayos a tiempos más largos de tratamiento (48 y 72 horas) se evaluó nuevamente el efecto inhibitor de la actividad ALP por parte de los PLRx, tanto cuando actuaron individualmente (+VEH), como en presencia de E2 (10 nM) (**Figura 91**).

En los resultados se observó que tanto el PLR-56 (IC<sub>50</sub> = 0,8–2 μM) como el PLR-67 (IC<sub>50</sub> = 2–3 μM), inhibían la potente actividad ALP inducida por E2 a ambos tiempos en las células tumorales de endometrio (**Figura 91B y 91D**). Sin embargo, al administrarse en ausencia de E2, los compuestos mostraron respuestas distintas, observándose un leve efecto agonista (0–25% respecto al VEH) por parte del PLR-56, que no se observó en el PLR-67 (**Figura 91A y 91C**). El control 4-OHT ejerció un efecto agonista parcial en estas células a ambos tiempos de tratamiento, inhibiendo parcialmente la actividad ALP inducida por E2 (IC<sub>50</sub> = 0,3–2 μM) y estimulándola en ausencia de este (EC<sub>50</sub> = 0,3–3 μM) (**Figura 91A y 91C**).





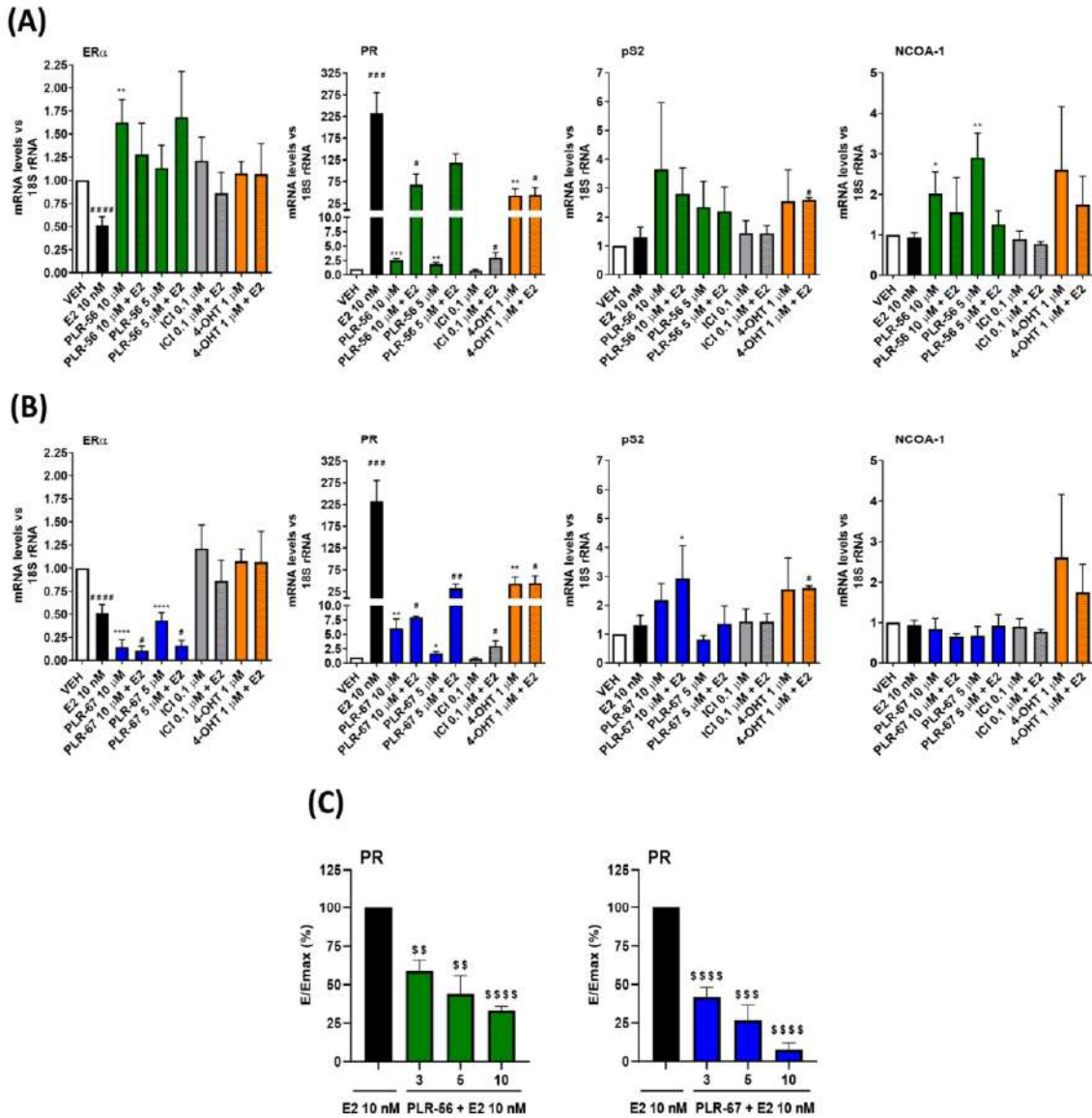
**Figura 91.** Evaluación de la actividad estro- y antiestrogénica de los PLRx sobre la actividad enzimática fosfatasa alcalina (ALP) inducida por E2 en células Ishikawa. Las células Ishikawa fueron tratadas con VEH (0,05 % DMSO), 4-OHT (0,3–3  $\mu$ M) o compuestos (0,3–10  $\mu$ M) durante (A) – (B) 48 o (C) – (D) 72 horas, en ausencia (+VEH) o presencia de E2 (10 nM) en condiciones de deprivación estrogénica (0.5 % de DCC-FBS), tras lavados previos durante 1 semana (10 % de DCC-FBS). En los paneles (A) (48 horas) y (C) (72 horas) se presentan las curvas de dosis-respuesta de los compuestos de estudio mediante la representación del logaritmo decimal de la concentración del compuesto frente a la E/Emax (%), calculada a partir de la Emax encontrada con el ligando natural E2 (10 nM). Las dosis de compuesto actuando solo (+VEH) se representan como  $\blacktriangle$  para 4-OHT,  $\bullet$  para PLR-56 y  $\blacksquare$  para PLR-67, mientras que las dosis de producto actuando en presencia de E2 (10 nM) se representan como  $\blacktriangle$  para 4-OHT,  $\bullet$  para PLR-56 y  $\blacksquare$  para PLR-67. En los paneles (B) (48 horas) y (D) (72 horas) se presentan en diagramas de barras, la E/Emax (%) de las dosis de producto + E2 (10 nM), calculadas a partir de la Emax (100 %) del E2 tras el tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía, aplicando la corrección del *post hoc test* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  para las comparaciones de los tratamientos combinados con E2, con respecto a las células estimuladas con E2 (+VEH).

#### 11.4.Regulación de la expresión de genes dependientes del ER en células de cáncer de endometrio ER+

A continuación, se evaluó mediante q-RT-PCR, el efecto que los compuestos PLR-56 y PLR-67 ejercían sobre los niveles de expresión de ARNm de *ER $\alpha$*  y otros genes regulados por estrógenos (*PR*, *pS2* y *NCOA-1*), tanto actuando solos (+VEH) como en presencia de E2 (10 nM) tras 24 horas de tratamiento en células Ishikawa. (Figura 92).



IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



**Figura 92.** Estudio de los efectos de los PLRx sobre la expresión génica de *ERα*, *PR*, *NCOA-1* y *p52* medida en ensayos de q-RT-PCR en células Ishikawa. Las células fueron deprivadas de estrógenos durante 5 días y sembradas en medio con 5 % DCC-FBS antes de ser sometidas a los diferentes tratamientos. Posteriormente, las células fueron tratadas con VEH (0.05% DMSO), 4-OHT (1 μM), (A) PLR-56 o (B) PLR-67 (ambos entre 3-10 μM) durante 24 horas o fueron preincubadas durante 3 horas con los mencionados productos antes de la estimulación con E2 (10 nM), manteniendo estos tratamientos durante 24 horas. La modulación de la expresión génica se estudió por PCR cuantitativa a tiempo real (q-RT-PCR) usando el gen *18S* como *housekeeping* para la normalización. En los paneles (A) y (B) se presentan los datos del PLR-56 y PLR-67, respectivamente, como valores de media ± error estándar de la media (SEM) de la expresión transcripcional relativa de cada gen respecto al gen *18S*, normalizando a su vez respecto a la expresión basal del vehículo, calculada para al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó comparando las medias de cada tratamiento mediante una T-Student de dos colas. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  respecto a los niveles de expresión del VEH; y # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$ , respecto a los niveles de expresión génica de los productos actuando en presencia de E2. En el panel (C), se muestran las gráficas de barras para el gen *PR* y su modulación correspondiente con los productos PLR-56 y PLR-67 en combinación con E2. En ellas se presentan los valores E/Emax (%) para cada tratamiento, calculado a partir de la máxima eficacia (100 %) obtenida para el E2. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA de una vía seguida del *post hoc test* de Bonferroni.  $^{SS}p < 0.01$ ;  $^{SSS}p < 0.001$ ;  $^{SSSS}p < 0.0001$  con respecto a las células tratadas con E2.

Los resultados de los ensayos de q-RT-PCR mostraron que el E2 disminuyó la expresión del gen *ER $\alpha$*  (0,49 veces), incrementó la de *PR* (233 veces) y *pS2* (1,3 veces) y no modificó la de *NCOA-1*, con respecto a las células no tratadas (VEH) (**Figura 92**). El fármaco control ICI no alteró significativamente la expresión de *ER $\alpha$* , *pS2* ni *NCOA-1*, mientras que el 4-OHT no moduló *ER $\alpha$* , pero sí incrementó levemente la expresión de *pS2* y *NCOA-1*, tanto solo como combinado con el agonista (**Figura 92**). Además, ambos fármacos redujeron significativamente la expresión de *PR* (3-40 veces) en presencia de E2 (**Figura 92**). Sin embargo, cabe destacar que el 4-OHT incrementó la expresión de *PR* (44 veces) en ausencia de E2, con respecto al nivel de expresión observado en las células tratadas con VEH (**Figura 92**), exhibiendo de esta manera, su característico comportamiento agonista parcial en endometrio (54,90,98). El PLR-56 (10  $\mu$ M) incrementó levemente la expresión de *ER $\alpha$*  al actuar individualmente, respecto al número de copias de ARNm del VEH. En su combinación con E2, el incremento en los niveles de expresión no fue significativo respecto al tratamiento con el agonista. Además, no moduló la expresión de *pS2* en ausencia de E2, pero tampoco en presencia de la hormona (**Figura 92A**). Este producto sí inhibió marcadamente la expresión génica del *PR* inducida por el agonista a todas las dosis ensayadas, aunque también estimuló su actividad transcripcional actuando solo (+VEH) en relación con el nivel de expresión basal (VEH) (**Figura 92A y 92C**), como también ocurrió con la sobre-expresión de *NCOA-1* (**Figura 92A**). Por su parte, el PLR-67 redujo la expresión del *ER $\alpha$*  actuando tanto solo (+VEH) como en presencia de E2 e incrementó (a la dosis de 10  $\mu$ M) los niveles de expresión de *pS2* cuando se combinó con E2, en comparación con los niveles de ARNm del *pS2* inducidos por E2 (**Figura 92B**). Adicionalmente, el PLR-67 disminuyó los niveles de ARNm del *PR* en presencia de E2 (**Figura 92B y 92C**) y también sobre-expresó el gen *PR* en ausencia de la hormona, aunque a un nivel muy inferior que el 4-OHT (**Figura 92B**). Contrariamente al PLR-56 (**Figura 92A**), el PLR-67 no promovió un aumento del número de copias de ARNm para *NCOA-1* (**Figura 92B**) cuando ambos productos actuaron solos (+VEH).

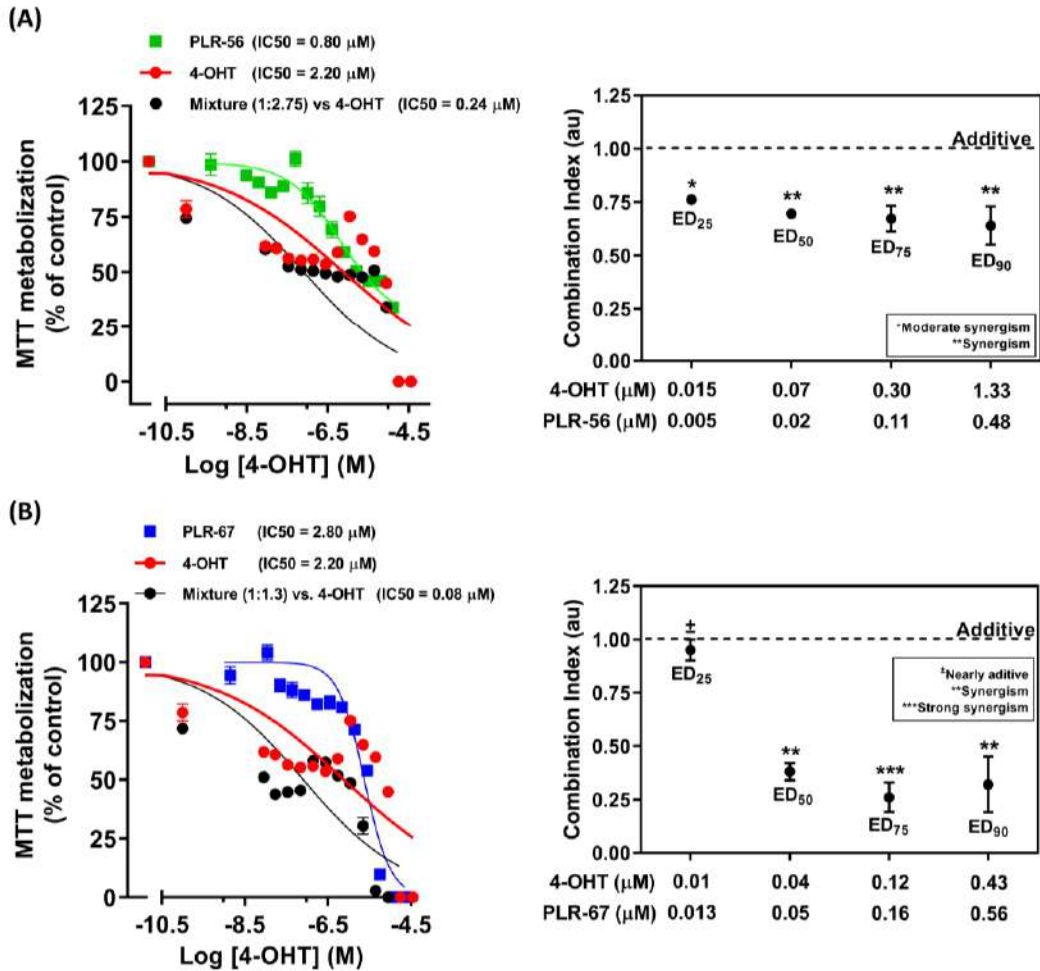
Todas las evidencias recopiladas en los estudios de inhibición de la viabilidad, la proliferación, la actividad enzimática ALP y la transcripción génica de *ER $\alpha$*  y genes ER-dependientes en células Ishikawa, permitieron caracterizar a PLR-56 y PLR-67 como compuestos antagonistas parciales en útero, con escasos o nulos efectos estrogénicos cuando los productos actuaron solos y potentes efectos antiestrogénicos cuando se combinaron con E2.

## 12. Ensayos de combinación PLRx – 4-OHT en células de cáncer de mama ER+ y células de mama sanas

La combinación de fármacos puede permitir la aparición de efectos farmacológicos sinérgicos (la acción de la combinación de fármacos es más potente que la suma de las acciones de cada fármaco por separado), lo que permite reducir las dosis de cada uno de ellos y dificulta la aparición de resistencias (216). Estas aparecen frecuentemente para muchos fármacos antitumorales, el 4-OHT entre ellos (64,102). De esta forma, se investigó si los compuestos PLRx líderes eran capaces de actuar sinérgicamente con el 4-OHT (*gold-standard* terapéutico usado en el tratamiento del cáncer de mama ER+), potenciando los efectos antiproliferativos de este último, mediante ensayos de combinación del PLR-56 o PLR-67 y 4-OHT. Para estos estudios se usaron las células MCF-7 que fueron tratadas durante 72 horas con distintas dosis de cada compuesto coadministrado con 4-OHT, manteniendo un ratio de concentración constante [PLR-56 (1):4-OHT (2,75) o PLR-67 (1):4-OHT (1,3)], y se determinó el efecto de estas combinaciones y de los fármacos individualmente sobre la viabilidad celular (**Figura 93**). Estos ensayos demostraron que tanto el PLR-56 como el PLR-67 potenciaban la inhibición de la viabilidad celular inducida por el 4-OHT en células de cáncer de mama ER+ tras 72 horas de tratamiento (**Figura 93**). De esta forma, ambas combinaciones permitieron obtener valores de IC50 entre 3–10 veces menores a los obtenidos para cada uno de los productos individualmente (**Figura 93A y 93B**).

Además, los datos de los estudios de viabilidad celular fueron analizados mediante el cálculo del índice de combinación o *combination index* (CI), el cual permite determinar si las combinaciones ensayadas se comportan de manera sinérgica, aditiva o antagónica, utilizando para ello el estudio del isoblograma mediante el método de Chou-Talalay (216). Así, se demostró que ambas combinaciones (PLR-56/4-OHT y PLR67/4-OHT) actuaron sinérgicamente inhibiendo la viabilidad de las células MCF-7, sobre todo a las dosis efectivas (*effective dose* o ED): ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub> (**Figura 93A y 93B**).

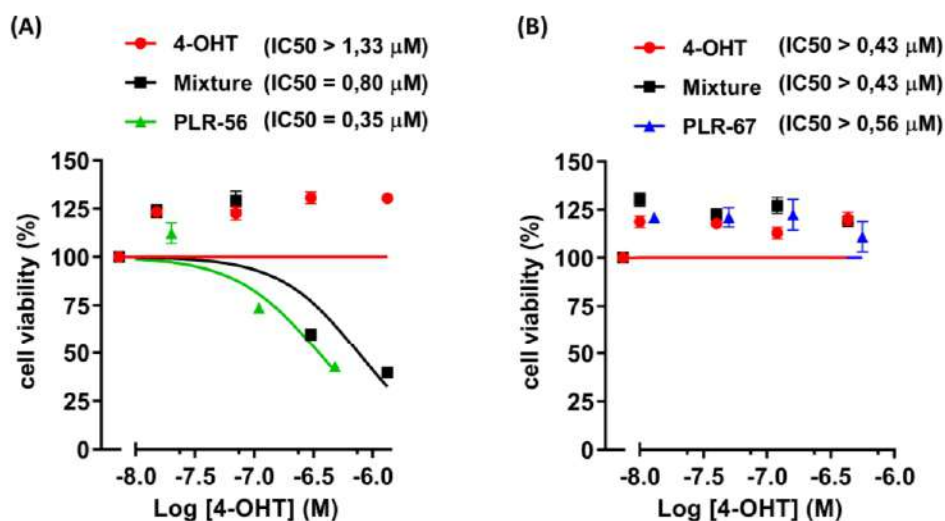
IV. RESULTADOS. CAPÍTULO II



**Figura 93.** Ensayos de combinación (sinergia) PLRx/4-OHT sobre la viabilidad de las células MCF-7. **(A)** Panel izquierdo: se representa la gráfica dosis-efecto obtenida a partir de los datos de viabilidad de células MCF-7 tratadas con PLR-56 (■; 0,0004–12,8  $\mu$ M), 4-OHT (●; 0,001–35,2  $\mu$ M) o con una combinación de ambos (● mixture) manteniendo un ratio constante [PLR-56 (1):4-OHT (2,75)] durante 72 horas. Panel derecho: análisis del isoblograma (determinación del índice de combinación, CI: *combination index*) de los datos presentados en las curvas dosis-efecto del panel izquierdo. El efecto, que varió entre 0 (no existe inhibición de la viabilidad celular) a 1 (100% de inhibición de la viabilidad celular), se analizó usando el programa informático Calcsyn®, lo que permitió determinar si la combinación PLR-56/4-OHT se comportó o no de manera sinérgica a las dosis efectivas (ED: *effective dose*) 25, 50, 75 y 90. **(B)** Panel izquierdo: se representa la gráfica dosis-efecto obtenida a partir de los datos de viabilidad de células MCF-7 tratadas con PLR-67 (■; 0,0014–22,4  $\mu$ M), 4-OHT (●; 0,001–35,2  $\mu$ M) o con una combinación de ambos (● mixture), manteniendo un ratio constante (PLR-67 (1):4-OHT (1,3)) durante 72 horas. Panel derecho: análisis del isoblograma (determinación del índice de combinación, CI: *combination index*) de los datos presentados en las curvas dosis-efecto del panel izquierdo. El efecto se analizó usando el programa informático Calcsyn®, lo que permitió determinar si la combinación PLR-67/4-OHT se comportó o no de manera sinérgica a las ED 25, 50, 75 y 90.

Posteriormente, se investigó si las combinaciones de dosis de PLR-56/4-OHT y PLR-67/4-OHT (ED<sub>25</sub>, ED<sub>50</sub>, ED<sub>75</sub> y ED<sub>90</sub>) que se habían comportado sinérgicamente para inhibir la viabilidad de las células MCF-7 (**Figura 93**), eran capaces de hacerlo también en las células sanas de mama MCF-10A tras 72 horas de tratamiento (**Figura 94**).





**Figura 94.** Evaluación de los efectos de la combinación de 4-OHT y los compuestos PLR-56 y PLR-67 sobre la viabilidad de células de mama sanas MCF-10A. Se presentan las gráficas dosis-efecto tras 72 horas de tratamiento de: (A) los productos solos; 4-OHT (0,015; 0,07; 0,3 y 1,33 μM), PLR-56 (0,005; 0,02; 0,11 y 0,48 μM) o en combinación y (B) los productos solos; 4-OHT (0,01; 0,04; 0,12 y 0,43 μM), PLR-67 (0,013; 0,05; 0,16 y 0,56 μM) o en combinación. En ambos casos se representa el logaritmo decimal de la concentración del 4-OHT frente al porcentaje de viabilidad celular de cada tratamiento individual o combinado, con respecto a las células no tratadas (VEH, 0.05 % DMSO). Las curvas permitieron el cálculo de un valor medio de IC<sub>50</sub> para cada tratamiento a partir de las réplicas experimentales. Las dosis de compuesto evaluadas sobre las diferentes estirpes de células se representan como ■ para las combinaciones (*Mixture*) de compuestos 4-OHT-PLRx, ● para las dosis de 4-OHT, ▲ para las dosis de PLR-56 y ▲ para las dosis de PLR-67.

Los resultados mostraron que la combinación PLR-56/4-OHT produjo una inhibición de la viabilidad de las células MCF-10A similar a la producida por el compuesto PLR-56 solo (**Figura 94A**). Sin embargo, las dosis combinadas de menor concentración (4-OHT: 0,015 y 0,07 μM; PLR-56: 0,005 y 0,02 μM) no presentaron efectos inhibitorios sobre células MCF-10A de mama sanas (**Figura 94A**). En el caso de la combinación PLR-67/4-OHT se observó que la viabilidad de células MCF-10A no se veía afectada a ninguna de las dosis testadas, del mismo modo que tampoco lo hizo el producto PLR-67 (**Figura 94B**).

# V. DISCUSIÓN

---



## V. DISCUSIÓN

El cáncer de mama ER+ depende de los estrógenos para crecer, reproducirse y sobrevivir (21,32). Los ER son considerados actualmente, una diana terapéutica de enorme interés, ya que su modulación, bloqueo o inactivación ha supuesto importantes avances clínicos en el tratamiento del cáncer de mama dependiente de estrógenos (39). De hecho, la terapia con antiestrógenos (hormonoterapia) presenta una alta efectividad, lo que permite un mejor pronóstico clínico y una mayor supervivencia libre de enfermedad (90). No obstante, a pesar de que en los últimos años se ha profundizado enormemente en su uso terapéutico, el tratamiento prolongado con SERMs, SERDs y AIs genera, frecuentemente, la aparición de resistencia endocrina, citotoxicidad, efectos adversos y falta de selectividad (11,39,90). Todos estos argumentos justifican la urgente búsqueda de alternativas de tratamiento, con nuevos compuestos que mantengan las ventajas de los fármacos ampliamente utilizados como el tamoxifeno, pero que ofrezcan nuevas propiedades farmacológicas y permitan eludir sus desventajas terapéuticas (55,220). La búsqueda de nuevas moléculas SERM/SERD puede realizarse a partir de la diversidad ofrecida por los productos naturales, que presentan una amplia riqueza de estructuras químicas privilegiadas (125). Entre estas estructuras, el ER y los estrógenos han sido previamente validados biológicamente y funcionan como guías estructurales para la síntesis de nuevas moléculas del espacio químico biológicamente relevante (142). La presente Tesis Doctoral tiene el objetivo de buscar, identificar y caracterizar nuevos productos antitumorales y antiestrogénicos en cáncer de mama ER+, a partir de la evaluación farmacológica preclínica de quimiotecas con una estrategia de cribado PDD o mixta (PDD y TDD).

En el primer capítulo de resultados de esta Tesis Doctoral se abordó un cribado PDD de hasta once quimiotecas mediante ensayos de viabilidad celular por MTT, lo que permitió identificar productos con actividad antitumoral en distintas estirpes de cáncer de mama (ER+, HER2+ y TNBC). Los resultados obtenidos llevaron a establecer relaciones entre la estructura química de ciertos productos y las actividades biológicas detectadas, lo que abre la posibilidad a estudiar algunas quimiotecas en mayor profundidad, o bien, utilizar la información biológica de los productos más relevantes para la síntesis de nuevos compuestos.

La primera serie de compuestos evaluados, referida a derivados de la embelina con núcleos de pirazol (PMA-Px) o acridina (PMA-Acx), permitió la detección de productos con actividad antitumoral en el rango  $\mu\text{M}$  en células de cáncer de mama TNBC (BT-549), HER2+ (SK-BR-3) y ER+ (MCF-7), con baja citotoxicidad en células renales sanas (Vero). Algunos de los compuestos presentaron cierta selectividad para una estirpe de cáncer de mama concreta respecto a otras (PMA-P10 en BT-549, PMA-P24 en SK-BR-3, PMA-P29 en MCF-7), lo que podría estar indicando un cierto tropismo hacia una diana terapéutica específica. De los resultados de esta serie, destaca la potente actividad antitumoral de los compuestos en células BT-549 y la nula actividad inhibitoria en otras estirpes celulares TNBC frecuentemente exploradas como, por



## V. DISCUSIÓN

ejemplo, MDA-MB231 o Hs 578T. La complejidad molecular existente en los cánceres de mama TNBC podría dar respuesta a las diferencias observadas en las tres líneas celulares exploradas, dónde la alteración de ciertas proteínas y su modulación terapéutica podría estar orquestada por vías diferentes (25). Otros trabajos de investigación recientes han descrito la capacidad inhibitoria de productos derivados de la embelina con un núcleo pirazólico en células tumorales ER+ (161), con una actividad antitumoral similar a la encontrada en el cribado de la quimioteca de productos PMA-Px. Los resultados para estos compuestos fueron publicados recientemente por nuestro grupo en un estudio más amplio, donde se detectó actividad biológica en cáncer de mama y leucemias de distinto origen (158). Por otro lado, los compuestos PMA-Acx fueron ensayados en tres líneas de cáncer de mama TNBC, destacando el producto PMA-Ac12. Los resultados revelaron una mayor potencia antitumoral en células tumorales de mama para los compuestos PMA-Px que para los derivados PMA-Acx. Tal y como proponen otros estudios, los productos con un núcleo de acridina podrían tener una mayor eficacia en la inhibición de la viabilidad celular de células hematológicas (160) o cáncer de colon humano (221), que en tumores sólidos de mama.

El cribado farmacológico de la segunda quimioteca de compuestos tipo espirodímeros (SPx) mostró compuestos con baja actividad antitumoral en células de cáncer de mama TNBC, a excepción de los compuestos SP-5 y SP-31, cuyas estructuras podrían tomarse como líderes para la creación de una nueva quimioteca de compuestos espirocíclicos con mejores propiedades. Al respecto, cabe destacar que Eldehna *et al.*, (2018), obtuvieron valores de IC<sub>50</sub> en el rango  $\mu\text{M}$  bajo para determinados productos líderes dentro de una quimioteca de compuestos tipo espirooxindoles en células TNBC (162). Estos resultados son similares a los obtenidos para los SPx en la presente Tesis Doctoral. Muy posiblemente, las limitaciones que presentan los compuestos espirocíclicos en términos de metabolización, su complicado proceso de síntesis y solubilidad (143), requiera de una detenida revisión para obtener resultados de mayor relevancia. La asociación de compuestos espiro con cetonas o lactonas podría mejorar la actividad biológica de estos compuestos, tal y como indica un estudio realizado en células leucémicas (222).

En la librería de compuestos metálicos con chalconas y lapachol (CMx) se obtuvieron resultados de actividad biológica prometedores en todas las estirpes de cáncer de mama estudiadas, gracias a la modificación química de las moléculas en su fusión con ligandos metálicos. Estos resultados se detallan en mayor profundidad en una publicación resultado de la colaboración entre nuestro grupo y QUIBIONAT (145). De esta forma, se observa como la introducción de átomos metálicos unidos a chalconas y lapachol, permite obtener productos que presentan una actividad antitumoral en el rango  $\mu\text{M}$  bajo en células de cáncer de mama y leucemia. Respecto a las neoplasias de mama, la introducción de cobalto en la estructura de los compuestos favorece una mayor potencia antitumoral en células ER+, mientras que la fusión

## V. DISCUSIÓN

organometálica con cobre parece inducir una mayor selectividad en células HER2+. Algunos de los compuestos CMx resultaron ser más potentes que otros compuestos organometálicos con lapachol estudiados por otros investigadores en cáncer de mama HER2+, cuyos valores de IC50 se encuentran entre 72–165  $\mu\text{M}$  (223). En otra investigación, el tamoxifeno se vectorizó con compuestos orgánicos asociados a metales sin encontrar una potenciación de los efectos antiproliferativos respecto al propio SERM en células ER+, ni efectos citotóxicos sobre células TNBC (224). Además, otro trabajo comparó las propiedades biológicas de compuestos orgánicos con rutenio frente al cisplatino en cáncer de mama TNBC y ER+ tras 24 horas de tratamiento, obteniendo una menor potencia antitumoral en células MDA-MB231 (IC50 = 30–200  $\mu\text{M}$ ) y la ausencia de efectos antitumorales en células MCF-7 (IC50 > 200  $\mu\text{M}$ ) (225). Así, se comparan con los resultados obtenidos para la quimioteca de productos CMx. El empleo de fármacos quimioterápicos basados en metales está aprobado para cisplatino, oxaliplatino y carboplatino. Sin embargo, la adquisición de resistencia al tratamiento y los efectos secundarios indeseados hacen que se haya limitado su uso (225). La síntesis de compuestos ligados a complejos metálicos con nuevas propiedades biológicas abre la puerta a nuevos estudios y su posible utilización terapéutica.

El cribado PDD de la serie de productos análogos de un híbrido naftoquinona-cumarina (JKSTx) generó interesantes resultados en diferentes estirpes de cáncer de mama y leucemia. La potencialidad terapéutica de los derivados naftoquinónicos y de los híbridos naftoquinona-cumarina ha permitido la identificación, por parte de nuestro grupo de investigación, de nuevos productos, con una actividad antitumoral destacable tanto en cánceres hematológicos (leucemia mieloide crónica) como no hematológicos (cáncer de mama) (146,147). En relación con el cáncer de mama, en esta Tesis Doctoral se identificaron productos de la serie JKSTx con potente actividad antitumoral en el rango nM alto –  $\mu\text{M}$  bajo. Existen numerosas evidencias previas que han puesto de manifiesto las interesantes propiedades farmacológicas de las cumarinas, lo que justifica su consideración como estructura privilegiada (170,226). Por ejemplo, en un estudio reciente se testó la ferulina C, un sesquiterpeno cumarina, en células MCF-7 y MDA-MB231, obteniendo valores de IC50 hasta 10 veces más elevados (227) que los encontrados en el cribado PDD de la serie JKSTx para algunos de sus compuestos. La exploración de las propiedades antiestrogénicas y la caracterización molecular de los efectos de los híbridos naftoquinona-cumarina en el contexto del cáncer de mama, requerirá de investigación adicional. Al respecto, se considera relevante la posible combinación de los JKSTx con 4-OHT en estudios de sinergia, tomando como referencia un interesante estudio en el que la combinación de  $\alpha$ -pironas aisladas de extractos de *Streptomyces* incrementó la sensibilidad al tamoxifeno de células MCF-7 resistentes (228).

## V. DISCUSIÓN

La quinta quimioteca de productos explorada para valorar su potencial antitumoral fue la de los compuestos quinónicos con un anillo de tiofeno (PFx) o piridona (Pym-1), cuyo esqueleto está basado en la quinona heterocíclica lawsona. El compuesto de origen (2-amino-tieno-[2,3-f]-benzofurano-4,8-diona) presenta actividad antitumoral y actúa como un inhibidor multiquinasa sobre proteínas de señalización intracelular como JAK y STAT (173). Las quinonas constituyen productos naturales con estructuras privilegiadas de alto interés biomédico (168). Entre ellas, la shikonina destaca por presentar actividades antitumorales y antiestrogénicas en células ER+ con valores de IC50 en el rango nM y  $\mu$ M (229). Los datos de inhibición de la viabilidad celular de los compuestos PFX permitió la identificación de productos muy potentes (rangos de dosis similares a la shikonina) en las distintas estirpes de cáncer de mama estudiadas. El compuesto Pym-1, generado por la fusión de una quinona con un anillo de piridona, resulta particularmente destacable por su prometedora actividad antitumoral tanto en células tumorales de mama, como de endometrio y leucemia, con escasa citotoxicidad en células renales sanas (Vero). La profundización en los mecanismos que inducen los efectos de Pym-1 en los citados modelos celulares, podría abrir un interesante trabajo en el futuro, así como servir como punto de partida para la síntesis de una nueva librería de compuestos.

La siguiente quimioteca evaluada biológicamente fue la de compuestos derivados de moléculas de tipo antraquinonas (PCKx) como la emodina. Esta molécula constituye un producto natural con actividad antitumoral y antimetastásica en células de cáncer de mama, cuyo mecanismo de acción parece estar mediado a través del receptor P2X7R, que se encuentra sobreexpresado en diversos tumores (175). Para la emodina, también se ha identificado actividad antitumoral en leucemias y cáncer hepático (230), así como actividad antiinflamatoria (231). En nuestros estudios, los resultados obtenidos para los PCKx fueron poco llamativos a las dosis exploradas, obteniéndose una nula eficacia antitumoral en células de cáncer de endometrio y cáncer de mama TNBC, con tan solo dos productos con potencia antitumoral notable en células T47D (PCK-13 y PCK-16). Se considera relevante plantear un cribado PDD de esta serie en cáncer de hígado en el futuro y la evaluación biológica orientada a la detección de una potencial actividad antiinflamatoria de estos compuestos.

La séptima librería de compuestos estudiada se corresponde con la de los análogos simplificados de la marmicina A, una antraquinona glicosilada natural, para la que se ha encontrado una importante actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama (176) y cáncer de colon (232). El cribado PDD fue realizado en células de cáncer de mama (TNBC y ER+), así como de endometrio ER+, encontrando una nula capacidad antitumoral en las primeras y detectando una interesante actividad antitumoral en las últimas. Extender el cribado PDD sobre células de cáncer de colon podría tener elevado interés biomédico, especialmente en España,

## V. DISCUSIÓN

donde esta es una patología de alta incidencia (4). Del mismo modo, profundizar en el entramado molecular que inhibe la viabilidad de las células endometriales, podría ser relevante, de cara a continuar describiendo las propiedades antitumorales de los productos MARx.

Otra de las quimiotecas evaluadas mediante cribado PDD en la presente Tesis Doctoral, se refiere a los compuestos derivados de la piritildiona (R-Pyr). La piritildiona está actualmente en desuso (177), pero su posible reposicionamiento como fármaco antitumoral podría tener una gran relevancia desde un punto de vista biomédico. Existen evidencias previas de sus propiedades antitumorales en próstata y leucemia (179), si bien en los ensayos realizados en células de cáncer de mama ER+, no se observó una actividad antitumoral significativa a las dosis estudiadas. La reevaluación de esta quimioteca en otras estirpes de mama y otras tipologías tumorales podría permitir la obtención de resultados de mayor relevancia.

Además del cribado PDD de las quimiotecas descritas con anterioridad, en este trabajo se realizó un cribado farmacológico mixto (PDD y TDD) de tres quimiotecas (1,3,5-triaril pirazoles sustituidos, PSx; derivados de lignanos, LGx; y pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas, PLRx). Las librerías en cuestión fueron diseñadas y sintetizadas racionalmente mediante estudios *in silico*, que predecían computacionalmente la interacción de los compuestos de estudio con los ER y su potencial modulación. Esto justifica la evaluación de sus propiedades biológicas en el contexto del cáncer de mama, concretamente de células ER+. De esta forma, se exploraron fenotípicamente sus propiedades antitumorales mediante ensayos de inhibición de la viabilidad celular; y se definió preliminarmente su potencialidad estro- y antiestrogénica en ensayos de luciferasa dependientes del ER $\alpha$  (40).

La primera de las series sometida a cribado mixto fue la de compuestos tipo 1,3,5-triaril pirazoles sustituidos (PSx). Esta librería fue diseñada, inspirándose en la estructura del 1,3,5-tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT), con el objetivo de establecer moléculas con capacidad de unión y modulación específica del ER $\alpha$ . Los ensayos transcripcionales de luciferasa revelaron la existencia de compuestos con actividad agonista (PS-12, PS-18 y PS-20), superagonista (PS-32, PS-28) y otros con actividad antiestrogénica significativa (PS-9, PS-21). A excepción del producto PS-9, los otros compuestos de la serie mostraron una reducida potencia antitumoral a las dosis exploradas, al no afectar a la viabilidad celular ni en medio completo ni en medio libre de estrógenos. Estos resultados sugieren que la modulación transcripcional del ER $\alpha$  no tiene influencia sobre el estado metabólico de las células. La combinación de los resultados del cribado mixto de los PSx con los valores obtenidos virtualmente por *docking* molecular permitió elegir los compuestos más interesantes de la serie PSx (PS-9 y PS-21), que fueron caracterizados en mayor profundidad. Ambos exhibieron un comportamiento característico de antagonistas no competitivos, capaces de reducir la potencia y eficacia del E2 en células de cáncer



## V. DISCUSIÓN

de mama ER+. Estos compuestos mostraron, además, propiedades farmacocinéticas adecuadas en su perfil de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) predictivo *in silico*. Los ensayos de unión al ER $\alpha$  recombinante humano (rhER $\alpha$ ) sugirieron que los efectos producidos sobre la transcripción y la actividad metabólica de las células se producen por una unión física directa al rhER $\alpha$ , al menos para el caso del PS-21. Sin embargo, el PS-9 exhibió una afinidad diez veces menor por el ER $\alpha$ , lo que sugiere que sus efectos podrían estar mediados por otros mecanismos y otras vías de señalización. A este respecto, se estudió la posible modulación transcripcional de otros receptores nucleares. Los efectos desencadenados por los PS-9 y PS-21 sobre los ER, no implicaron una modulación colateral de la actividad transcripcional dependiente del AR. Sin embargo, ambos productos sí inhibieron, en diferente grado, la actividad transcripcional dependiente del GR en presencia de DEX, sugiriendo con ello una modulación transcripcional "*multi-target*", a través de la transactivación de distintos receptores de hormonas esteroideas. La información disponible para los compuestos líderes de la quimioteca de los PSx requiere de una ampliación en futuros estudios. En otro trabajo, los investigadores exploraron la actividad citotóxica de derivados 1,3,4-triaril pirazoles en células ER+, observándose una notable actividad antiproliferativa para los productos líderes de esa serie, detectando la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis por la activación de las caspasas 3/7 (233). Si bien, en este estudio no se investigaron los efectos de estos compuestos sobre la actividad transcripcional. Teniendo en cuenta los resultados de inhibición de la viabilidad celular de los PSx a dosis altas, sería coherente que los estudios de los perfiles del ciclo celular demostraran la existencia de un bloqueo en el ciclo celular normal de células ER+ dependientes. Esto podría confirmarse con estudios de proliferación en presencia y ausencia de estrógenos, además de mediante la expresión de proteínas implicadas en el ciclo celular. La descripción de otras propiedades, que informen de fenómenos celulares relevantes permitirá una mejor caracterización de la serie PSx y una más precisa definición de su mecanismo de acción molecular.

La quimioteca de derivados de lignanos (LGx) fue cribada mediante una estrategia mixta: PDD y TDD. Estos productos fueron sintetizados por su conocida capacidad de interacción con los ER (54). A nivel transcripcional, en ensayos de luciferasa dependientes del ER en células T47D-KBluc, algunos LGx (LG-5 y LG-6) mostraron propiedades estrogénicas parciales cuando actuaron individualmente, así como efectos superagonistas al combinarse con E2. Estos datos concuerdan con otros obtenidos para una serie de lignanos tipo dibencilbutano, que mostraron actividad mitogénica sobre la proliferación de células MCF-7/BUS (183). Otros LGx de la serie mostraron comportamiento antagonista parcial, al reducir la actividad transcripcional dependiente de ER e inducida por E2, sin afectar a la viabilidad de células T47D-KBluc en medio libre de estrógenos. Los lignanos se consideran SERM naturales, para los que se ha identificado una capacidad moduladora de la proliferación en cáncer de mama, próstata y ovario ER+ (144). Sin

embargo, ese efecto no fue cuantificable en términos de reducción de la viabilidad celular en las estirpes de cáncer de mama ER+ estudiadas en medio estrogénico completo. Los resultados del cribado mixto sumados a los datos de *docking* molecular realizados sobre la estructura cristalizada del *Ligand Binding Domain* (LBD) del ER $\alpha$  en conformación antagonista para el 4-OHT, permitieron la selección de los compuestos antiestrogénicos líderes (LG-7, LG-8, LG-9, LG-11). Todas estas moléculas comparten un modo de unión similar en el bolsillo de unión hidrofóbico del LBD del ER $\alpha$ , mostrando que la presencia de grupos hidroxilo en su estructura, permite interacciones claves que explican su actividad biológica antagonista parcial sobre el ER $\alpha$ . Además, los LGx se caracterizaron como antagonistas no competitivos de la transcripción dependiente del ER en los ensayos de luciferasa, al actuar reduciendo tanto la potencia como la eficacia del E2. Este efecto parece producirse por una interacción física directa con el rhER $\alpha$  con una potencia en el rango  $\mu$ M bajo, aunque su afinidad de unión es bastante menor que la de los agonistas puros (E2 y DES) empleados. Como existe un alto grado de homología en el dominio LBD de los receptores nucleares humanos de hormonas esteroideas, se estudiaron los efectos de los LGx, sobre la actividad transcripcional mediada por AR y GR. Estos ensayos descartaron una actividad agonista de los LGx sobre estos receptores. Además, los productos LG-9 y LG-11 no inhibieron la transcripción mediada por AR o GR e inducida por TEST o DEX. En cambio, el LG-7 y el LG-8 inhibieron parcialmente la transcripción mediada por GR y por GR y AR, respectivamente, inducida por sus respectivos agonistas. Finalmente, los LGx líderes fueron caracterizados mediante un estudio ADME predictivo, que indicó un buen perfil de similitud a fármaco (*drug-likeness*) al presentar propiedades farmacocinéticas adecuadas. Los principales resultados de la evaluación farmacológica de los LGx se incluyeron en una reciente publicación de nuestro grupo en colaboración con QUIBIONAT (144). La determinación de las propiedades de actividad biológica de los productos LGx continúa en estudio y está centrada en su potencial capacidad para interferir con la proliferación de células dependientes de ER. Posteriormente, si se demostrase un efecto antiproliferativo, podrían tomarse como referencia los estudios realizados por Majdalawieh *et al.*, (2019) sobre el lignano sesamol (234). De esta manera, se podría investigar si los LGx ejercen sus efectos antitumorales y antiestrogénicos al modular determinadas vías de señalización relevantes, estudiadas en el mencionado trabajo, tales como p53, MAPK, JNK, PI3K/AKT, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, PPAR $\gamma$ , caspase-3, Nrf2, eNOS, y LOX (234). La descripción de otras propiedades que informen de fenómenos celulares relevantes, tales como apoptosis o ciclo celular, permitirá una mejor caracterización molecular de los líderes de la serie LGx.

La última quimioteca evaluada en esta Tesis Doctoral se refiere a compuestos tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas con anillos aromáticos y derivados de auronas como el resorcinol (PLRx). Esta clase de compuestos contiene una estructura privilegiada (heterociclo con

## V. DISCUSIÓN

dos grupos arilo adyacentes) y ha sido explorada por distintos grupos de investigación al poseer interesantes actividades farmacológicas, destacando su actividad antitumoral en cáncer de mama, leucemia y células epiteliales de diferentes órganos (186,235,236). La serie de productos PLRx fue diseñada y sintetizada a partir de estudios SAR, inspirándose en la estructura química de moléculas como el E2 o el raloxifeno (RAL) y aplicando estudios computacionales de *docking* molecular basados en la unión de ligandos como RAL o 4-OHT a los ER. El RAL es un SERM bien caracterizado, que muestra propiedades adecuadas en términos de preservación de la densidad ósea y efectos agonistas sobre el sistema cardiovascular, funcionando como antagonista en cáncer de mama ER+ y útero (108,109). De un modo similar al tamoxifeno, el RAL se asocia al dominio LBD de los ER, reposicionando la hélice 12 hacia la superficie del dominio AF-2 y bloqueando la unión de coactivadores (54). Los compuestos de la serie química de los PLRx mantienen el núcleo central de cinco miembros presente en el RAL, presentan grupos hidroxilos que, situados adecuadamente, confieren una alta afinidad por los ER y muchas moléculas disponen de una cadena lateral tipo piperidinetoxi o pirrolidinetoxi, que favorece un cambio conformacional sobre la hélice-12 de ambos ER y promueve una acción antagonista sobre algunos tejidos (237). El *docking* molecular realizado permitió predecir virtualmente, el grado de interacción de los PLRx con los ER. Como resultado de este estudio, se estimaron los "*Glide scores*" en pose conformacional antagonista con 4-OHT y RAL para los compuestos, mostrando valores adecuados de energía libre.

Los PLRx se evaluaron biológicamente mediante un cribado farmacológico mixto (PDD y TDD). Los experimentos sobre la viabilidad de células de cáncer de mama revelaron la existencia de productos citotóxicos para células HER2+ y ER+. Algunos de ellos lo hicieron selectivamente sobre células HER2+, otros sobre células ER+, y, productos como, por ejemplo, PLR-56 y PLR-67, sobre ambas. Paralelamente, los estudios de la modulación transcripcional dependiente del ER $\alpha$  mostraron la ausencia generalizada de actividad estrogénica para estos productos, que, sin embargo, exhibieron diferentes grados de actividad antagonista al ser combinados con E2. Si bien, la potencia antiestrogénica de ICI y 4-OHT fue muy superior que la de los PLRx, coincidiendo con otro estudio previamente publicado (238).

La combinación de los resultados de *docking* molecular y del cribado mixto facilitaron una primera elección de cuatro compuestos líderes de la serie PLRx: PLR-1, PLR-51, PLR-56 y PLR-67. A nivel transcripcional los productos PLR-1 y PLR-56 fueron caracterizados como antagonistas competitivos del ER $\alpha$  en un perfil similar al del 4-OHT (123), donde el E2 fue capaz de recuperar su máximo efecto sin reducir significativamente su potencia, a pesar de estar en presencia de estos compuestos. Sin embargo, los compuestos PLR-51 y PLR-67 se definieron como antagonistas no competitivos, como el ICI (113), al reducir unas 5 veces el efecto agonista del E2. Adicionalmente, los PLRx preseleccionados fueron evaluados fenotípicamente en diferentes estirpes de cáncer de mama ER+, HER2+, TNBC y cáncer de endometrio ER+,

## V. DISCUSIÓN

observándose una potente acción antitumoral para PLR-56 y PLR-67. Los resultados obtenidos con estos dos productos permitieron establecer una correlación entre la inhibición de la viabilidad y la actividad antiestrogénica transcripcional mediada por el ER $\alpha$ , sugiriendo que al menos una parte de los efectos citotóxicos podrían estar mediados por un mecanismo dependiente del ER. PLR-56 y PLR-67 presentaron una mayor eficacia en la inhibición del crecimiento que la determinada para otras pirrolidonas en otros estudios similares (186,235). En otro trabajo, se sintetizaron 3,4-diaril-pirrolin-dionas y 3,4-diaril-pirrolinonas a partir del producto natural combretastatina-A4 (CA-4), obteniéndose compuestos con actividad citotóxica en el rango nM– $\mu$ M en células leucémicas y de cáncer de pulmón (239), si bien su actividad no fue explorada en cáncer de mama ER+. También se ha descrito una potente actividad antiproliferativa (rango nM) para otros compuestos de tipo pirroles, derivados también de la CA-4, en células leucémicas y, en este caso, de cáncer de mama (236).

Un dato clínicamente relevante obtenido a partir del cribado de los productos PLR-56 y PLR-67 fue la notable y selectiva actividad antitumoral en células de cáncer de mama y endometrio ER+, presentando por el contrario una baja toxicidad en modelos de células sanas. La baja toxicidad observada *in vitro* debe ser validada en futuros experimentos de toxicidad aguda (test de Irwin) y subcrónica, *in vivo*.

Sin embargo, también cabe destacar que los productos presentaron efectos citotóxicos en células MCF-10A de mama sanas (células ER, PR y HER2 negativas) (190) a las mismas dosis a las que afectaron a la viabilidad celular de las estirpes tumorales. Este hecho podría estar señalando la existencia de dianas farmacológicas comunes en células epiteliales de mama, ya sean tumorales o normales. Las células MCF-10A, a pesar de ser no tumorales, expresan marcadores moleculares propios de un fenotipo de cáncer de mama luminal (ER+), basal (TNBC) o de células madre epiteliales (240,241). Con el fenotipo luminal, propio de células MCF-7 por ejemplo, comparte marcadores como la expresión de citoqueratinas (CK: CK7, CK8 y CK18), GATA3 (240), quinasas como la asociada a Fyn o el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R) (242), así como la mucina 1 y E-cadherina (241). La pérdida de la E-cadherina se relaciona con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que implica una mayor capacidad de migración y metástasis (243). Las células de mama no tumorales también comparten rasgos del fenotipo tumoral basal mediante la expresión de vimentina,  $\alpha$ -actina de músculo esquelético, CK5, N-cadherina (241), EGFR, activador de plasminógeno o TGFB1 (244).

Los compuestos PLR-56 y PLR-67 exhibieron, además, una potencia antitumoral similar o superior a la del 4-OHT, pero inferior a la del ICI en células de cáncer de mama ER+. Otro dato relevante es que ni el 4-OHT ni el ICI inhibieron la viabilidad de células TNBC y HER2+, mientras que los PLR-56 y PLR-67 sí que lo hicieron. Nuevamente, estos resultados podrían estar sugiriendo la existencia de dianas moleculares moduladas por estos productos, que estarían presentes en todas las estirpes celulares de cáncer de mama estudiadas. La proteína tumoral 53



## V. DISCUSIÓN

(TP53) y STAT5 son dos marcadores moleculares presentes en células ER+, células TNBC y células de mama sanas (240,242), que podrían estar orquestando el crecimiento y la supervivencia *in vitro*. La hipótesis de que los PLRx líderes afecten a proteínas compartidas entre linajes celulares deberá ser evaluada en futuras investigaciones.

Los resultados de inhibición de la viabilidad celular por parte de los PLRx en células T47D deprivadas de estrógenos, fueron similares a los obtenidos en células crecidas en medio completo, lo que sugiere que estos efectos son independientes de la carga estrogénica del medio y que podrían producirse por mecanismos alternativos y complementarios a la modulación del ER, a través de otras vías y factores de transcripción. En este sentido y debido al alto grado de homología del dominio LBD de los receptores nucleares, cabe preguntarse si el efecto de los PLRx es específico sobre el ER $\alpha$  de células tumorales de mama ER+, o si también afecta a otros receptores de hormonas esteroideas tales como AR o GR. Ni PLR-56 ni PLR-67 exhibieron un efecto de transactivación de estos receptores nucleares, ni cuando actuaron solos ni en presencia de los agonistas específicos de cada receptor en células MDA-kb2 (195), corroborando la hipótesis planteada a nivel de los receptores nucleares. Sin embargo, estudiando otros factores de transcripción, sí se detectó una significativa inhibición transcripcional mediada por STAT3 (y estimulada por IL-6) con el PLR-56 en células HEK293; y por STAT5 (y estimulada por IL-3) con el PLR-67 y 4-OHT en células Ba-F3. La inhibición transcripcional de ER $\alpha$  y STAT podría repercutir en la inhibición de la ciclina D1 (218), lo que requiere confirmación en futuros experimentos. Los ensayos de expresión de STAT5 total por *Western blot* (WB) confirmaron que la inhibición transcripcional no se producía a nivel de proteína con ninguno de los PLRx, mientras que sí parecía hacerlo con el tratamiento con 4-OHT. Las proteínas STAT, especialmente STAT1, STAT3 y STAT5a/b están sobre-expresadas en todos los subtipos de cáncer de mama (86). Cabe plantearse, por tanto, que la inhibición transcripcional de STAT3 o STAT5 inducida por los PLRx repercute en la activación que las proteínas STAT ejercen en último término sobre PI3K, AKT y mTOR, proteínas esenciales en procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación celular (11). Existen evidencias de conexión funcional entre la ruta de señalización IL-6/STAT3 y ER $\alpha$  en contextos tumorales, aunque publicaciones recientes demuestran la existencia de un programa transcripcional activado por IL-6/STAT3 independiente del ER en cáncer de mama, promoviendo un fenotipo más agresivo y metastásico (245). La modulación transcripcional de STAT3 inducida por el PLR-56 amplía su potencial farmacológico al dirigir la terapia a esta ruta oncogénica de manera complementaria al ER $\alpha$ . En otro estudio, se indica que la terapia dirigida a STAT5 supone una estrategia adecuada para suprimir la actividad del ER e inducir apoptosis en cáncer de mama ER+ (246), por lo que posiblemente, PLR-67 y 4-OHT estén ejerciendo un programa de señalización que involucra la inhibición transcripcional de ambos factores de transcripción y la inducción de apoptosis.

## V. DISCUSIÓN

Posteriormente, se estudió el efecto de los dos PLRx seleccionados sobre la proliferación y la citotoxicidad en células ER+, en presencia y ausencia de estrógenos. En medio estrogénico completo, los PLR-56 y PLR-67 se comportaron como agentes citostáticos de lenta actividad antiproliferativa (requirieron al menos 72 horas para inducir sus efectos) en células de cáncer de mama ER+, exhibiendo efectos duraderos, mientras que el ICI actuó como citostático y el 4-OHT como citotóxico a 10  $\mu$ M y como citostático al resto de dosis. La potencia antitumoral de los compuestos fue dependiente de la dosis y del tiempo de exposición a cada producto, tal y como se deduce de su cinética de crecimiento a tiempo real en una dosis-tiempo, destacando la atenuación de su efecto cuando se aplicaron tiempos de exposición menores en experimentos de *wash-out*. Ambos productos demostraron tener una baja citotoxicidad tanto en cultivos 2D como en cultivos de esferoides 3D, sirviendo estos últimos para reproducir más fielmente la biología tumoral y representando una aproximación más adecuada a su potencialidad *in vivo* (201,247). En condiciones de privación estrogénica, los productos interfirieron de forma citostática en el crecimiento de células estimuladas con E2, estableciéndose para ambos un perfil de antagonistas no competitivos. De esta forma, se observó una mayor actividad antitumoral tanto de los PLRx preseleccionados como de los controles 4-OHT e ICI cuando los ensayos fueron realizados en medio carente de estrógenos, lo que sugiere que estos efectos antiproliferativos dependen, al menos en parte, de los ER y de su bloqueo.

Los ensayos de unión de los PLRx al ER $\alpha$  confirmaron que los productos se unen físicamente tanto al rhER $\alpha$  como al ER $\alpha$  presente en extractos citosólicos de útero procedentes de rata ovariectomizadas (RUC), si bien es cierto que lo hacen con mucha menor afinidad que los controles experimentales utilizados (4-OHT, DES y E2). Estos resultados de *binding* al ER $\alpha$  sugieren que los efectos duraderos observados con los PLRx líderes se deben, no tanto a uniones fuertes entre los productos y la diana, sino a efectos postranscripcionales y postraduccionales que suceden tras la unión fármaco-diana (248,249). En conjunto, los resultados indican que los efectos antiestrogénicos ejercidos por los productos dependen, al menos en parte, de su unión y bloqueo de los ER, existiendo además otros mecanismos alternativos que deberán ser explorados en mayor profundidad.

Con relación al efecto antiproliferativo de los PLRx, los experimentos de citometría de flujo indicaron que existe un bloqueo en el ciclo celular que es dependiente del tiempo (al menos 48h) y de la dosis, observándose un incremento estadísticamente significativo de células en subG1, así como un aumento de células en G0/G1, con reducción concomitante de células en G2/S/M para el PLR-67. En un trabajo similar, se estudió el efecto de 3-hidroxi-3-pirrolin-2-onas sobre el ciclo de células MDA-MB231, encontrando que el uso de dosis de los compuestos estudiados a 100  $\mu$ M no era capaz de generar un bloqueo en su ciclo celular (235). Cuando el bloqueo del ciclo celular genera un incremento de células en fase subG1, es posible que se produzcan fenómenos de muerte celular programada por el incremento de células hipodiploides

## V. DISCUSIÓN

o muertas (250). La evaluación de los fármacos de interés en relación con la regulación de la apoptosis es importante para caracterizar sus efectos antitumorales, ya que las células tumorales disponen de la capacidad de eludir la apoptosis en favor de su supervivencia (6). En este sentido, el PLR-56 incrementó el número de células Anexina V (+) por externalización de la fosfatidilserina a las 48h y 72h tras el tratamiento, mientras que el PLR-67 y el 4-OHT lo hicieron a las 72h en un efecto dependiente del tiempo de exposición. La profundización acerca de los actores moleculares intervinientes en la apoptosis (activación de distintas caspasas por ruta intrínseca, extrínseca o por ambas) requiere de investigación adicional.

Con respecto al estudio ADME, todos los valores del perfil predictivo estuvieron dentro del intervalo recomendado para cada parámetro farmacocinético, mostrando propiedades potencialmente favorables al respetarse las reglas de Lipinski (198,199). Todos los compuestos presentaron nula o escasa actividad potencial sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), un buen perfil para su administración oral y adecuados valores de permeabilidad intestinal y renal. Sin embargo, estas características contrastaron con la predicción de un activo metabolismo hepático, que prevé varias transformaciones metabólicas de los compuestos. Esto posiblemente, se deba a la elevada liposolubilidad de estos compuestos y sugiere la búsqueda de vías de administración alternativas a la vía oral para evitar, aunque sea parcialmente, este importante fenómeno de primer paso hepático. Una potencial alternativa podría ser la administración de estos compuestos por vía intraperitoneal, que evite parcialmente el fenómeno del primer paso hepático. Otra posibilidad podría ser el cambio de la formulación de los compuestos para convertirlos en productos más hidrosolubles (sales) que puedan ser administrados por vía oral. Ambas alternativas requieren de investigación futura en ensayos de farmacocinética *in vivo*.

A nivel molecular, la hiperactivación del ER $\alpha$  (isoforma de 66 kDa) constituye el principal rasgo fisiopatológico del cáncer de mama ER+ (21,46), orquestando el crecimiento y la supervivencia tumoral en su activación aberrante promovida por los estrógenos (39,66). Los productos PLR-56 (tras al menos 12 horas de preincubación) y PLR-67 (tras 3 horas de preincubación) modularon la transcripción dependiente de ER $\alpha$  en los ensayos de gen reportero de luciferasa en células T47D-KBluc. Para ver si existía también una modulación sobre la expresión proteica del ER $\alpha$ , se investigó el efecto de los productos en ensayos de inmunodetección. Los resultados de WB demostraron que ambos PLRx producían una inhibición de la proteína dependiente del tiempo de exposición (a partir de las 24 horas para el PLR-67 y solo tras 72 horas para el PLR-56) y de la dosis para el PLR-56. Estos datos fueron confirmados por estudios de inmunofluorescencia, en los que se observó que el pretratamiento con el PLR-56 no modificaba la expresión nuclear de ER $\alpha$  tras 24h, mientras que el pretratamiento con PLR-67 generó, sin embargo, una reducción significativa del nivel de expresión nuclear de ER $\alpha$ , así como

## V. DISCUSIÓN

su desaparición del citoplasma. Estos resultados concuerdan con el mayor tiempo de exposición requerido con el PLR-56 para modular la actividad transcripcional y proliferativa de células ER+ tumorales, con efectos altamente dependientes del tiempo. Los niveles proteicos de ER $\alpha$  se redujeron drásticamente e irreversiblemente tras 24 horas de tratamiento con ICI (110,219) y se estabilizaron con el tratamiento con 4-OHT y otros SERM como RAL, sin afectar a su degradación en células T47D y MCF-7, tal y como ya habían establecido otros estudios (218).

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo por el cual los PLRx reducen la expresión proteica del ER $\alpha$ , se estudiaron los niveles de proteínas poliubiquitinadas, ya que su *turnover* está mediado por su ubiquitinación y posterior degradación proteasómica (38). El PLR-56, el 4-OHT y el ICI no mostraron efectos evidentes sobre las proteínas ubiquitinadas a ninguna de las dosis y tiempos estudiados. En el caso del ICI, al funcionar como un SERD de elevada potencia, es posible que la ubiquitinación del ER $\alpha$  se esté produciendo mucho antes de las 24h y que la proteína se esté degradando antes de ese período. El 4-OHT, pese a estabilizar la proteína en una conformación que la protege de la degradación, indujo un bloqueo en la proliferación y la transcripción dependiente del ER $\alpha$ , lo que indica que la degradación del ER $\alpha$  no es el único mecanismo antiestrogénico (218). Por su parte, el tratamiento con el PLR-67 desencadenó la inhibición del ER $\alpha$  y esto se correlacionó con un incremento en la cantidad de proteínas poliubiquitinadas igualmente dependiente del tiempo (desde las 24h y hasta las 72h tras el tratamiento), lo que sugiere un mecanismo de activación de la degradación proteasómica similar al ICI (251,252) o al bazedoxifeno (218), a través de la subunidad 26S (38). Estos resultados requieren de una futura validación en experimentos con un inhibidor del proteasoma (como, por ejemplo, el MG-132), que pueda confirmar que el cotratamiento con dicho compuesto es capaz de bloquear la actividad proteolítica del proteasoma (253) e impedir la inhibición proteica del ER $\alpha$  promovida por el PLR-67. De validarse estos resultados, este compuesto podría considerarse un nuevo SERD con un interesante perfil biológico en cáncer de mama ER+, cuyo posible mecanismo de acción estaría basado en interferir con el E2 bloqueando la transcripción y la translocación nuclear del ER $\alpha$  desde el citoplasma, induciendo su degradación proteasómica y desencadenando el bloqueo del ciclo celular y la estimulación de la apoptosis.

Ambas pirrolidonas fueron evaluadas adicionalmente en lo que se refiere a su capacidad para modular la expresión de ER $\alpha$  y genes ER dependientes en células de cáncer de mama ER+. Se estudió la expresión de *PR*, una de las dianas más representativas de ER $\alpha$  (90,238) y el gen *pS2* (también llamado *TFF1*), que codifica para una proteína secretada en altos niveles en presencia de estrógenos (254,255). Como cabría esperar, el E2, al activar la ruta de los ER, incrementó los niveles de mRNA de *PR* y *pS2*, reduciendo la expresión de ER $\alpha$  (211,218). Los fármacos control ICI y 4-OHT no alteraron el nivel de mRNA del ER $\alpha$  en ausencia de E2, pero sí inhibieron la expresión de *PR* y de *pS2* cuando actuaron en su presencia, coincidiendo con datos



previos (111,256). En otro estudio reciente, se observó que el ICI sí alteraba los niveles de mRNA de *ERα* y reducía igualmente la expresión del gen *PR* (238). El PLR-56 no moduló la expresión de *ERα* ni de *pS2* ni en ausencia ni en presencia de E2, pero sí inhibió marcadamente la expresión génica del *PR* inducida por el agonista a todas las dosis ensayadas. Una posible explicación para este hallazgo reside en que el tratamiento con E2 induce la activación del *ERα* a nivel de proteína, produciéndose a su vez la activación del coactivador NCOA-1, responsable de la activación transcripcional del *PR* corriente abajo (38). El cotratamiento con el PLR-56 podría estar impidiendo la activación de dicho coactivador, antagonizando la función del ER, independientemente de la degradación proteasómica, consistente con los resultados de WB, en los que no se apreció dicha modulación. El mecanismo podría funcionar de una forma similar al descrito para SERDs como ICI o GDC0810, que son capaces de inhibir la señalización del ER y la proliferación dependiente de estrógenos, también en ausencia de degradación proteasómica (238). Por su parte, el PLR-67 no alteró los niveles del ARNm del *PR* ni en ausencia ni presencia de E2, disminuyó los niveles del ARNm de *pS2* en ausencia de la hormona y redujo la expresión del *ERα* inducida por el E2. Este último resultado concuerda con el obtenido en los experimentos de WB, donde podría estar produciéndose la inactivación de *ERα* por su degradación proteasómica, lo que conduce a la desaparición de la proteína y a su inhibición transcripcional. Sería de gran interés ampliar el estudio de q-RT-PCR con otros genes dependientes del *ERα*, tales como la *ciclina D1* (218), u otros como *GATA3* y *FOXA1* (257), *GPER* (229) o *Creatine Kinase B* (CKB) (258), con el objetivo de identificar si se ve afectada su expresión génica en respuesta a los tratamientos de los PLRx líderes en presencia o ausencia de E2.

Una de las mayores limitaciones encontradas en el desarrollo de nuevos SERMs/SERDs para la terapéutica del cáncer de mama ER+ reside en los efectos estrogénicos que dichas moléculas ejercen sobre el endometrio y ovario, incrementando la probabilidad de desarrollar cáncer y lesiones malignas en el útero. Este desafío clínico se presenta en mujeres tratadas con tamoxifeno o sus metabolitos (90,98). Ante esta limitación, frecuentemente se validan los efectos antitumorales y antiestrogénicos de los productos de interés, obtenidos en cáncer de mama, en un modelo de endometrio uterino (206,207). Así, los PLRx líderes se testaron en células Ishikawa para evaluar si afectaban a su viabilidad y proliferación, detectándose con ambos, una potencia antitumoral muy superior a la registrada para el 4-OHT. Los dos productos se comportaron como citostáticos en medio estrogénico completo y también exhibieron efectos antiestrogénicos cuando actuaron tanto solos como en combinación con E2, en células endometriales en condiciones de deprivación estrogénica, diferenciándose así, del agonismo parcial ejercido por el 4-OHT. Teniendo en cuenta estas evidencias, se investigó si el antagonismo observado en el modelo de cáncer endometrial estaba correlacionado con una modulación transcripcional dependiente de ER. Para ello se testó, en primer lugar, la expresión de la actividad enzimática fosfatasa alcalina

## V. DISCUSIÓN

(ALP), cuyo control está bajo estricta regulación estrogénica. El crecimiento de las células Ishikawa depende de estrógenos y de los ER, permitiendo este modelo una identificación adecuada de características agonistas y antagonistas de los productos ensayados (206,208). Los resultados confirmaron el carácter antagonista de los PLR-56 y PLR-67, que indujeron la inhibición de la actividad ALP tras 48h y 72h en su tratamiento combinado con E2, con una leve estimulación producida por el PLR-56 en ausencia de la hormona. Los resultados de los PLRx contrastaron con los efectos agonistas del E2 y el agonismo parcial del 4-OHT sobre la actividad enzimática de la ALP, tras 24 horas de tratamiento, potenciando dichos efectos tras 48 y 72 horas de una manera dependiente del tiempo, tal y como indican otros estudios recientemente publicados (206,259).

Para terminar de caracterizar la modulación transcripcional de ambos PLRx sobre células Ishikawa, se estudió su efecto sobre la expresión de genes dependientes del ER (*ERα*, *PR*, *NCOA-1* y *pS2*) tras 24 horas de tratamiento. Como ya ocurrió con las células de cáncer de mama ER+, el tratamiento con E2 disminuyó la expresión del gen *ERα* e incrementó la de *PR* y *pS2* con respecto a las células no tratadas (VEH), mientras que el tratamiento combinado de 4-OHT y E2 incrementó la expresión de *pS2*, no alteró el número de copias de ARNm para *ERα* y redujo significativamente la expresión del *PR* en células Ishikawa. Esto difiere de otros estudios en los que el tratamiento de 4-OHT o E2 genera un incremento en el número de copias de mRNA para el *ERα* (206). El tratamiento con E2 no produjo cambios en la expresión génica de *NCOA-1*. Por otro lado, el efecto uterotrófico del 4-OHT fue detectado al tratar las células en ausencia de E2 al observarse un incremento en la expresión de *PR*, *pS2* y *NCOA-1*, revelando, de esta forma, el característico comportamiento agonista parcial del 4-OHT en endometrio (54,90,98). Una de las hipótesis más aceptadas que explican este efecto del 4-OHT se refiere al reclutamiento del factor transcripcional NCOA-1, de carácter uterotrófico, cuando se produce la formación del complejo ER-4-OHT y su translocación al núcleo (54,91). Además, recientemente se ha descubierto que el 4-OHT actúa como agonista de GPER en endometrio, desencadenando con ello un efecto estimulador de células endometriales *in vitro*, posiblemente a través de un mecanismo que involucra la fosforilación de MAPK (78). El RAL o el ICI funcionan como antagonistas del ER en endometrio, al no inducir el reclutamiento del factor NCOA-1 (54,91) y no actuar como agonistas de GPER (78). El RAL presenta un perfil SERM similar al del tamoxifeno o 4-OHT, pero con un carácter neutral en el útero (260).

En relación con los efectos de los PLRx sobre la expresión génica en células Ishikawa, cabe destacar que el PLR-56 incrementó levemente la expresión de *ERα* actuando solo (+VEH), no modificó la expresión de *pS2* e inhibió marcadamente la expresión génica del *PR* inducida por el agonista a todas las dosis ensayadas. En un grado notablemente inferior al 4-OHT (206,261), tanto PLR-56 como PLR-67 estimularon levemente la actividad transcripcional del *PR* cuando actuaron individualmente (+VEH). Adicionalmente, se encontró un efecto agonista del PLR-56 (+VEH)

## V. DISCUSIÓN

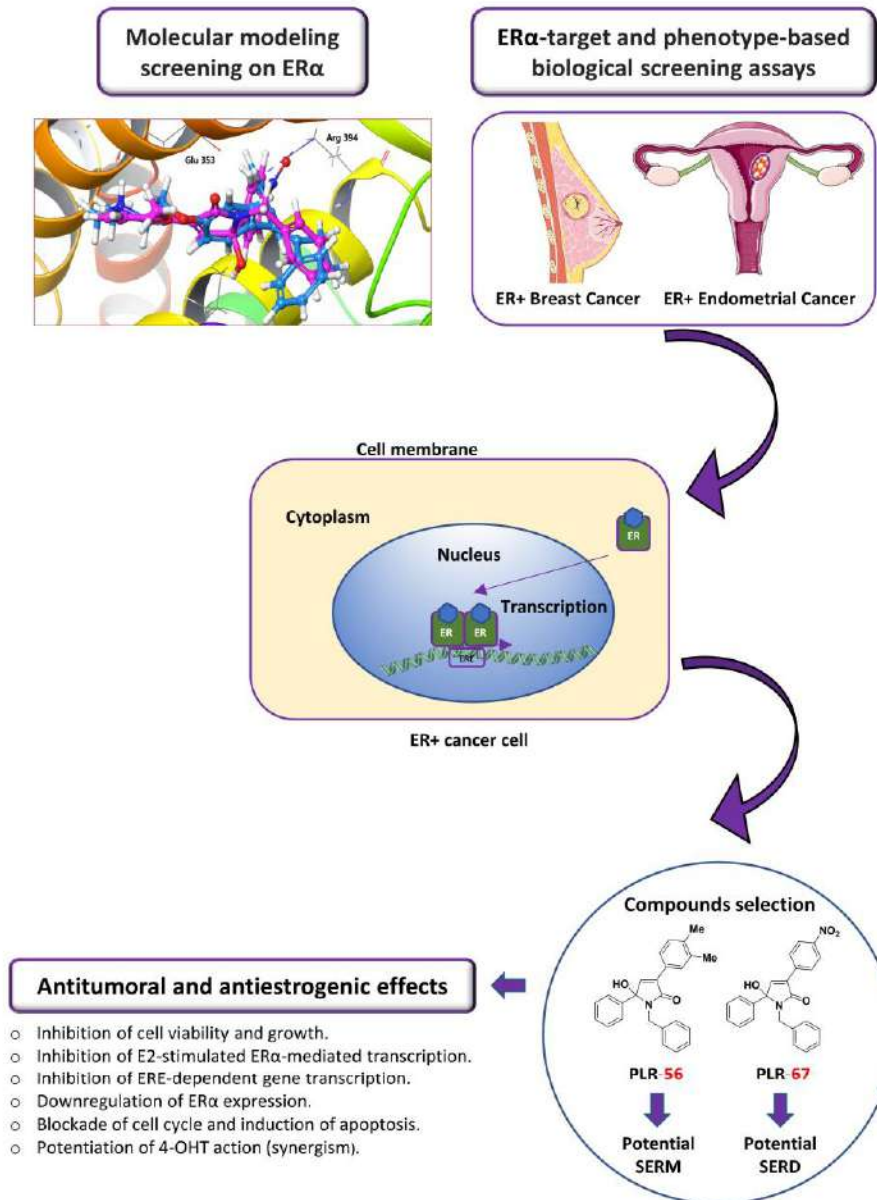
sobre la expresión génica de *NCOA-1*, lo que sugiere que el comportamiento agonista parcial también observado en los experimentos de actividad enzimática ALP, podría deberse a un reclutamiento de *NCOA-1* en un mecanismo similar al inducido por el 4-OHT (54,91). La menor afinidad de unión del PLR-56 al ER $\alpha$  con respecto al 4-OHT podría explicar su menor efecto uterotrófico. Por su parte, el PLR-67 estaría actuando por medio de un mecanismo molecular totalmente diferente, que involucraría la reducción de los niveles de ARNm de *ER $\alpha$*  y que, según datos preliminares de nuestro laboratorio, también afectaría negativamente a su expresión proteica (datos no mostrados) en células Ishikawa. En este sentido, resulta plausible plantearse que el incremento en las proteínas poliubiquitinadas encontrado en células de cáncer de mama, también pueda estar ocurriendo en células endometriales cancerosas. Además, el PLR-67 actuaría limitando los efectos estrogénicos del E2, al inhibir la transcripción del gen *PR*, sin efectos uterotróficos sobre *NCOA-1* ni sobre la actividad enzimática ALP, lo que lo convertiría en un interesante SERD potencial.

Otra de las grandes complicaciones clínicas que ha planteado históricamente el uso terapéutico del tamoxifeno y otros SERMs, es la adquisición de resistencia endocrina por el empleo de altas dosis o tratamientos prolongados en el tiempo (39,91). Al respecto, la combinación de fármacos puede permitir la aparición de efectos farmacológicos sinérgicos, reduciendo las dosis de cada uno de ellos en la combinación y dificultando así la aparición de resistencias (216). Los estudios de combinación planteados entre 4-OHT y los dos productos líderes demostraron que tanto el PLR-56 como el PLR-67 potencian la inhibición de la viabilidad celular inducida por el 4-OHT en células de cáncer de mama ER+ tras 72 horas de tratamiento, sin efectos citotóxicos graves sobre células de mama sanas. Este resultado es muy prometedor, porque podría permitir reducir la dosis de 4-OHT en combinación con estos compuestos, manteniendo su efecto antitumoral, lo que podría suponer un avance clínico de vital importancia.

En resumen, los resultados aportados por la presente Tesis Doctoral muestran que dos productos tipo pirrolidonas altamente funcionalizadas y derivados de auronas (PLR-56 y PLR-67) actúan como potentes inhibidores de la viabilidad y proliferación en células de cáncer de mama y endometrio ER+. Esto se explica, al menos parcialmente, por una inhibición transcripcional y proteica del ER $\alpha$  o de genes dependientes del ER en células de cáncer de mama ER+, donde los efectos antiproliferativos parecen ser más potentes en condiciones de ausencia de estrógenos y donde se produce una parada del ciclo celular acompañada de un incremento en el número de células apoptóticas. Para el PLR-56, la inhibición del crecimiento puede estar relacionada con la inactivación de la transcripción de *STAT3*, mientras que el PLR-67 podría estar modulando el crecimiento a través de una vía que afecta también a *STAT5* y que parece involucrar al proteasoma. Los dos compuestos, PLR-56 y PLR-67, mostraron evidencias de leve

## V. DISCUSIÓN

o escaso agonismo estrogénico y mantuvieron sus efectos antagonistas en células de endometrio, lo que los convertiría en interesantes candidatos que superan la limitación planteada por los efectos uterotróficos del tamoxifeno. Finalmente, ambos PLRx potencian los efectos antitumorales del 4-OHT *in vitro*, lo que sugiere que estas combinaciones de productos podrían resultar beneficiosas para el tratamiento del cáncer de mama ER+ (**Figura 95**) (262). Esto último requiere de una futura validación *in vivo*.



**Figura 95. Resumen gráfico de los principales resultados obtenidos para los compuestos PLR-56 y PLR-67 en células de cáncer de mama y endometrio ER+.** La ilustración resume el trabajo de investigación que lleva a la búsqueda, identificación y evaluación preclínica de los compuestos PLR-56 y PLR-67 como nuevas entidades químicas con potencialidad como SERMs o SERDs en cáncer de mama y endometrio ER+. Ambos productos inhiben la viabilidad y el crecimiento de células tumorales ER+, inhiben la transcripción dependiente del ER $\alpha$  estimulada por E2 en células de cáncer de mama ER+, así como la transcripción de genes dependientes de estrógenos. Además, inhiben también la expresión proteica de ER $\alpha$ , bloquean el ciclo celular, inducen apoptosis y potencian los efectos antitumorales del 4-OHT en células de cáncer de mama ER+. Esquema de elaboración propia con la base artística de la web de ilustraciones médicas (<https://smart.servier.com>). Adaptado de Guerra-Rodríguez *et al.* 2022 (262).



## V. DISCUSIÓN

La presente Tesis Doctoral cumple con su objetivo de identificar, caracterizar y evaluar farmacológicamente nuevos compuestos antitumorales y antiestrogénicos con potencialidad para la terapéutica del cáncer de mama, específicamente del subtipo ER+. Sin embargo, este trabajo de investigación presenta algunas limitaciones que resulta pertinente señalar, con el fin de mejorar sus resultados y el impacto real que puedan tener los mismos. Las características biológicas descritas para el PLR-56 y, especialmente, para el PLR-67, son muy prometedoras, pero están basadas en modelos celulares o computacionales, lo que abre el interrogante sobre sus efectos farmacológicos *in vivo*. Los resultados requieren una validación en modelos de cáncer de mama ER+ en animales (263). En este contexto, se hace necesario determinar el perfil farmacocinético de los productos seleccionando dosis para estudiar su biodisponibilidad *in vivo*, así como el planteamiento de ensayos para su toxicidad aguda (Test de Irwin) (264) y subcrónica (265), siguiendo las recomendaciones de la Organización para el Desarrollo y Cooperación Económica (OECD). Estos estudios de toxicidad tratarían de demostrar que los PLRx líderes no generan cambios en el estado fisiológico y comportamiento de ratones, evaluando la presencia de síntomas neurotóxicos, alteraciones en el peso, composición corporal, perfil bioquímico o la morfología de los órganos explorados en las necropsias. Adicionalmente, en el estudio para el desarrollo de nuevos SERMs/SERDs resulta imprescindible realizar un estudio uterotrófico para caracterizar la actividad SERM *in vivo* (266,267).

Por otro lado, la descripción molecular del mecanismo de acción de los productos líderes debe precisarse y ampliarse en mayor profundidad. Actualmente, se desconoce la capacidad de los PLRx para interferir con proteínas específicas (cambios en sus patrones de fosforilación o expresión) implicadas en la progresión tumoral, el ciclo celular o la regulación de la apoptosis. Estudios de *immunoblot* de proteínas como la del retinoblastoma (RB), las ciclinas A, B y E, las CDKs (268,269), la histona 3 (H3) (270), Wee1, Chk1 y Chk2 (271–273) podrían proporcionar información relevante acerca de la regulación del ciclo celular. La expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis (caspasas 3, 8 y 9, así como el corte proteolítico de PARP) (146) podría dotar de más información acerca de la muerte celular observada por los tratamientos con los PLR-56 y PLR-67. El estudio de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y survivina (274); o proapoptóticas como Bax/Bak, relevantes en tumores de mama (275), podría complementar la información disponible para otras dianas terapéuticas. Por ejemplo, la inhibición de Mcl-1 puede inducir un incremento del marcador  $\gamma$ H2AX de daños en el ADN de doble hebra, conduciendo a fenómenos de apoptosis y a la imposibilidad de las células para superar el bloqueo del ciclo en células de cáncer de mama (276).

Desde un punto de vista mecanístico, los resultados obtenidos en la investigación avalan la existencia de una modulación parcial a nivel transcripcional y proteica del ER $\alpha$  por parte de los PLRx líderes en células de cáncer de mama ER+. Los efectos *downstream* o la caracterización de los efectos no genómicos de los PLRx sobre la regulación de otras proteínas, podrían generar un

## V. DISCUSIÓN

nexo entre la modulación terapéutica del ER $\alpha$  y otras dianas en vías de señalización complementarias. Muchas proteínas como S6K, pSrc, P38, MAPK, Akt, JNK, ERK o p53 (34,39,277) intervienen en la supervivencia y crecimiento de células de cáncer de mama ER+. Además, es frecuente que las células ER+ y HER2+ expresen altos niveles de GPER (GPR30), responsable de los efectos no genómicos rápidos de los estrógenos y de la activación de la vía de crecimiento y supervivencia GPER/EGFR/MAPK/ERK (229).

Otra de las características biológicas pendientes de valoración se refiere a la evaluación farmacológica de los productos líderes en modelos de células resistentes al tamoxifeno o al ICI (278,279). Resulta vital poder demostrar que los compuestos de estudio son efectivos a la hora de superar la resistencia a quimioterápicos convencionales como ICI y 4-OHT, aportando una solución terapéutica a la resistencia tumoral, un problema de gran magnitud en la terapéutica del cáncer de mama ER+ (39).

Finalmente, y teniendo en cuenta la historia reciente en el desarrollo de nuevos SERMs y SERDs, podría ser relevante ampliar el perfil farmacológico de los PLRx en relación con la modulación de los ER en otros tejidos, tales como hueso (células osteoblásticas KS483), próstata (células DU-145 o PC-3) y SNC, tratando así de identificar, en estos productos, las características de un SERM ideal (124,280).



# VI. CONCLUSIONES

---





## VI. CONCLUSIONES

1. El cribado PDD de once quimiotecas de productos naturales permitió identificar compuestos de las series PSx, LGx y PLRx con potencia antitumoral en el rango nM– $\mu$ M en células tumorales de cáncer de mama ER+, HER2+ y TNBC. Estos compuestos fueron evaluados mediante cribado mixto (PDD+TDD) para determinar su potencialidad antiestrogénica en células de cáncer de mama ER+.
2. De todas las quimiotecas evaluadas, la de los PLRx presentó las actividades biológicas más interesantes (buenos valores de *docking* molecular con el ER $\alpha$  humano, unión física al ER $\alpha$ , inhibición de la viabilidad, proliferación y la transcripción dependiente de ER $\alpha$  en células de cáncer de mama ER+, perfil ADME). Estos resultados permitieron seleccionar a los compuestos líderes de la serie PLRx (PLR-56 y PLR-67).
3. PLR-56 y PLR-67 exhibieron una notable actividad antitumoral en células de cáncer de mama ER+ tanto en cultivos celulares 2D como en esferoides 3D, presentando una baja toxicidad en células sanas (Vero, PBMC y MCF-10A).
4. PLR-56 y PLR-67 mostraron una correlación entre sus actividades antitumorales y antiestrogénicas, al comportarse como antagonistas de la transcripción dependiente de ER $\alpha$  y de la proliferación y carecer de efectos estrogénicos. Los efectos de los compuestos fueron lentos, pero duraderos, así como dependientes de la dosis y el tiempo.
5. PLR-56 y PLR-67 desencadenaron una parada en el ciclo celular e indujeron apoptosis en células de cáncer de mama ER+ a partir de las 48-72 horas de tratamiento.
6. PLR-56 y PLR-67 inhibieron la expresión proteica constitutiva de ER $\alpha$  de una manera dependiente de la dosis y el tiempo en células ER+. El PLR-67 indujo su desaparición nuclear y citoplasmática a través de un mecanismo que produjo un incremento en la presencia de proteínas poliubiquitinadas y en el que podría estar involucrada la degradación proteasómica del ER $\alpha$ . Por su parte, el PLR-56 no afectó los niveles de proteínas poliubiquitinadas ni tampoco produjo cambios de expresión proteica del ER $\alpha$  a nivel subcelular.
7. El PLR-56 disminuyó los niveles de ARNm de *PR* sin alterar la expresión de *ER $\alpha$*  ni de *pS2*, mientras que el PLR-67 redujo la expresión génica de *ER $\alpha$*  sin modular la expresión de *PR* y *pS2* en presencia de E2 en células de cáncer de mama ER+.
8. Ni PLR-56 ni PLR-67 modularon la transcripción dependiente de los receptores nucleares AR y GR, por lo que sus efectos sobre los ER fueron específicos. Sin embargo, PLR-56 y PLR-67 inhibieron la transcripción dependiente de STAT3 y STAT5, respectivamente. Esto

## VI. CONCLUSIONES

sugiere que la regulación de las proteínas STAT podría estar implicada en el mecanismo de acción antitumoral de los PLRx líderes.

9. PLR-56 y PLR-67 presentaron una destacada potencia antitumoral y antiproliferativa en células tumorales endometriales ER+. Ambos productos disminuyeron la actividad enzimática de la ALP, así como la expresión génica de *PR*, estimuladas ambas por el E2, con escasos efectos uterotróficos. El PLR-67 redujo, además, el nivel de expresión génica de *ERα* sin sobre-expresar *pS2* ni *NCOA-1* en células Ishikawa.
10. La combinación de dosis submaximales de 4-OHT con PLR-56 y PLR-67 potenció sinérgicamente la inhibición de la viabilidad de células de cáncer de mama ER+, sin afectar a las células MCF-10A de mama sanas.

## VI. CONCLUSIONS

1. PDD screening of eleven chemical libraries based on natural products led to the identification of antitumoral compounds (in the nM–  $\mu$ M range) from the PSx, LGx, and PLRx series in ER+, HER2+, and TNBC breast cancer cells. These compounds were evaluated by a mixed screening (PDD+TDD) to determine their antiestrogenic potential in ER+ breast cancer cells.
2. From all the chemical libraries evaluated, the PLRx compounds showed the most interesting biological activities (good molecular docking values with human ER $\alpha$ , physical binding to ER $\alpha$ , inhibition of viability, proliferation, and ER $\alpha$ -dependent transcription of ER+ breast cancer cells, good drug-likeness ADME profile). These results allowed the selection of the leading compounds of the PLRx serie (PLR-56 and PLR-67).
3. PLR-56 and PLR-67 exhibited a remarkable antitumoral activity in ER+ breast cancer cells in both 2D cell cultures and 3D-spheroids models, presenting a low toxicity in non-tumoral cells (Vero, PBMC and MCF-10A).
4. PLR-56 and PLR-67 showed a correlation between their antitumoral and antiestrogenic activities, behaving as antagonists of ER $\alpha$ -dependent transcription and proliferation and lacking estrogenic effects. The effects of the compounds were slow, but long lasting, as well as dose and time dependent.
5. PLR-56 and PLR-67 triggered cell cycle arrest and induced apoptosis in ER+ breast cancer cells after 48-72 hours of treatment.
6. PLR-56 and PLR-67 inhibited the constitutive expression of ER $\alpha$  protein in a time- and dose-dependent manner in ER+ breast cancer cells. PLR-67 induced its nuclear and cytoplasmic disappearance in a mechanism, where an increase in polyubiquitinated proteins is implicated and where ER $\alpha$  turnover and proteasomal degradation could be involved. PLR-56 did not affect polyubiquitinated protein levels and it neither produced changes in ER $\alpha$  subcellular protein expression levels.
7. PLR-56 decreased *PR* mRNA levels without altering *ER $\alpha$*  or *pS2* gene expression, while PLR-67 decreased *ER $\alpha$*  gene expression with no modulation of *PR* and *pS2* genes in the presence of E2 in ER+ breast cancer cells.
8. Neither PLR-56 nor PLR-67 modulated nuclear receptors AR- and GR-dependent transcription, thereby triggering ER-specific effects. However, PLR-56 and PLR-67 inhibited STAT3- and STAT5-dependent transcription, respectively. These facts suggest the involvement of STAT proteins in the antitumoral mechanism of action of the leading PLRx compounds.



## VI. CONCLUSIONS

9. PLR-56 and PLR-67 exerted outstanding antitumoral and antiproliferative effects in ER+ endometrial cancer cells. Both products decreased the enzymatic ALP activity, as well as the *PR* gene expression, in both cases stimulated with E<sub>2</sub>, with scarce uterotrophic effects. PLR-67 also reduced *ERα* gene expression levels with no over-expression of *pS2* or *NCOA-1* genes in Ishikawa cells.
10. The combination of submaximal doses of 4-OHT with PLR-56 or PLR-67 synergistically potentiated the inhibition of ER+ breast cancer cells viability, without affecting non-tumoral MCF-10A breast cells.

# VII. BIBLIOGRAFÍA

---



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Virchow R. Cellular Pathology (1858). [Internet]. Thoemmes Continuum; 2004. (Origin of life debate / ed. and introd. by James E. Strick). Available from: <https://books.google.es/books?id=tHagAQAACAAJ>
2. World Health Organization. World Health Statistics overview 2019. World Health Organization. 2019.
3. World Health Statistic. Monitoring Health for the SDGs. World Heal Stat. 2019;
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
5. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther* [Internet]. 2016;38(7):1551–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>
6. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review Douglas. *Cell.* 2000;
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011.
8. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research.* 2017.
9. Grose RP, Senga SS. Hallmarks of cancer—the new testament. *Open Biol.* 2021;11:0–2.
10. Guerra B, Recio C, Aranda-Tavío H, Guerra-Rodríguez M, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L. The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front Oncol* [Internet]. 2021;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.626971>
11. Kulkoyluoglu-Cotul E, Arca A, Madak-Erdogan Z. Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 2019.
12. Bertos NR, Park M. Breast cancer - One term, many entities? *Journal of Clinical Investigation.* 2011.
13. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology.* 2011.
14. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. Breast cancer. Vol. 5, *Nature Reviews Disease Primers.* 2019.
15. Ritchie H, Roser M. Causes of Death, Our World in Data. *Our World in Data.* 2018.
16. Ross J, Slodkowska E, Symmans W, Puzstai L, Ravdin P, Hortobagyi G. The HER-2 receptor and breast cancer: Ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *The Oncologist* 2009;14(4):320-68. *Oncologist.* 2009;
17. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(9):1046–52.
18. Lakhani, S, Ellis. I, Schnitt, S, Tan, P, van de Vijver M. WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition. IARC WHO Classif Tumours, No 4. 2012;
19. Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. *Advances in Anatomic Pathology.* 2012.
20. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(7).
21. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME. Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: A systematic review of the literature. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2004.
22. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The HER-2/ neu Gene and



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy . *Oncologist*. 2003;
23. Slamon D, Clark G, Wong S, Levin W, Ullrich A, McGuire W. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (80- ). 1987;
  24. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747–52.
  25. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;
  26. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736–50.
  27. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):1–17.
  28. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;
  29. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SA, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(7):1688–98.
  30. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*. 2012.
  31. Lanning NJ, Castle JP, Singh SJ, Leon AN, Tovar EA, Sanghera A, et al. Metabolic profiling of triple-negative breast cancer cells reveals metabolic vulnerabilities. *Cancer Metab*. 2017;5:6-017-0168-x. eCollection 2017.
  32. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;
  33. Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol*. 2006;
  34. Fernandez-Cuesta L, Anaganti S, Hainaut P, Olivier M. P53 status influences response to tamoxifen but not to fulvestrant in breast cancer cell lines. *Int J Cancer*. 2011;
  35. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;
  36. Harris HA. Estrogen receptor- $\beta$ : Recent lessons from in vivo studies. *Molecular Endocrinology*. 2007.
  37. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. *Endocrine Reviews*. 2013.
  38. Smith CL, O'Malley BW. Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocrine Reviews*. 2004.
  39. Liang J, Shang Y. Estrogen and Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;
  40. Wilson VS, Bobseine K, Gray LE. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol Sci*. 2004;
  41. Colborn, T, Clement C. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. *Adv Mod Environmental Toxicol*. 1992;21.
  42. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güptür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- receptor signaling. Vol. 16, Reproductive Medicine and Biology. John Wiley and Sons Ltd; 2017. p. 4–20.
43. Adeel M, Song X, Wang Y, Francis D, Yang Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*. 2017.
  44. Bodzek M, Dudziak M. Removal of Natural Estrogens and Synthetic Compounds Considered to be Endocrine Disrupting Substances ( EDs ) by Coagulation and Nanofiltration. 2006;15(1):35–40.
  45. Santen RJ, Brodie H, Simpson ER, Siiteri PK, Brodie A. History of aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews*. 2009.
  46. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. Vol. 116, *Journal of Clinical Investigation*. 2006. p. 561–70.
  47. Shang Y. Molecular mechanisms of oestrogen and SERMs in endometrial carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2006 May;6(5):360–8.
  48. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004.
  49. Zhao L, Zhou S, Gustafsson J-Å. Nuclear receptors: recent drug discovery for cancer therapies. *Endocr Rev*. 2019;
  50. Levin ER, Hammes SR. Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016.
  51. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2009.
  52. Covalada AMS, Van den Berg H, Vervoort J, Van der Saag P, Ström A, Gustafsson JÅ, et al. Influence of cellular ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio on the ER $\alpha$ -agonist induced proliferation of human T47D breast cancer cells. *Toxicol Sci*. 2008;
  53. Magnani L, Patten DK. Fundamental pathways in breast cancer 3: Estrogen biology. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. 2017.
  54. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacological Reviews*. 2013.
  55. Rani A, Stebbing J, Giamas G, Murphy J. Endocrine resistance in hormone receptor positive breast cancer—from mechanism to therapy. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
  56. Jensen E V. On the Mechanism of Estrogen Action. *Perspect Biol Med*. 1962;6(1):47–60.
  57. Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;
  58. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;
  59. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van Der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 1998;
  60. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Molecular interventions*. 2003.
  61. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. *Curr Genomics*. 2006;
  62. Maurer RA, Notides AC. Identification of an estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene. *Mol Cell Biol*. 1987;
  63. Warner M, Gustafsson JÅ. Nongenomic effects of estrogen: Why all the uncertainty? *Steroids*. 2006.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

64. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiological Reviews*. 2007.
65. Smiley D, Khalil R. Estrogenic Compounds, Estrogen Receptors and Vascular Cell Signaling in the Aging Blood Vessels. *Curr Med Chem*. 2009;16(15):1863–87.
66. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorganic Chemistry*. 2017.
67. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER $\beta$  inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*. 2001;
68. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor  $\beta$  inhibits 17 $\beta$ -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;
69. Chaurasiya S, Widmann S, Botero C, Lin C-Y, Strom AM, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor  $\beta$  exerts tumor suppressive effects in prostate cancer through repression of androgen receptor activity. *bioRxiv*. 2019;
70. Thomas C, Gustafsson JÅ. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011;11(8):597–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3093>
71. Flouriot G. Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *EMBO J*. 2000;19(17):4688–700.
72. Zhao YW, Zhang XT, Shen P, Loggie BW, Chang YC, Deuel TF. Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor- $\alpha$ 36, a novel variant of human estrogen receptor- $\alpha$ 66. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;336(4):1023–7.
73. Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen–estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*. 2017.
74. Lo R, Matthews J. A new class of estrogen receptor beta-selective activators. *Mol Interv*. 2010;10(3):133–6.
75. Allen TD, Cronshaw JM, Bagley S, Kiseleva E, Goldberg MW. The nuclear pore complex: Mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci*. 2000;113(10):1651–9.
76. Ortega-Domínguez B, Herrera-Ramírez M, Tecalco-Cruz AC. Receptores Nucleares: Del Núcleo Al Citoplasma. *Tip*. 2015;18(2):131–43.
77. Hammes SR, Levin ER. Extranuclear steroid receptors: Nature and actions. *Endocr Rev*. 2007;28(7):726–41.
78. Hu R, Hilakivi-Clarke L, Clarke R. Molecular mechanisms of tamoxifen-associated endometrial cancer (Review). *Oncol Lett*. 2015;
79. Gorrini C, Mak TW. Fundamental pathways in breast cancer 2: Maintenance of genomic stability. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. 2017.
80. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 2005;146(2):624–32.
81. Weiss DJ, Gurskii E. Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens. *J Steroid Biochem*. 1988 Oct;31(4B):671–6.
82. Su T, Qu J-J, Wang K, Li B-L, Zhao D, Zhu Y-P, et al. Cross-talk between p21-activated kinase 4 and ER $\beta$ ; signaling triggers endometrial cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 2017;
83. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010.
84. Poloz Y, Dowling RJO, Stambolic V. Fundamental pathways in breast cancer 1: Signaling from the membrane. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. 2017.
85. Yang J, Altahan A, Jones DT, Buffa FM, Bridges E, Interiano RB, et al. Estrogen receptor- $\alpha$

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- directly regulates the hypoxiainducible factor 1 pathway associated with antiestrogen response in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;
86. Furth PA. STAT signaling in different breast cancer sub-types. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;
  87. Butt AJ, McNeil CM, Musgrove EA, Sutherland RL. Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Jul;12 Suppl 1:S47-59.
  88. Gompel A, Somaï S, Chaouat M, Kazem A, Kloosterboer HJ, Beusman I, et al. Hormonal regulation of apoptosis in breast cells and tissues. *Steroids*. 2000;65(10–11):593–8.
  89. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA [Internet]*. 2019 Jan 22;321(3):288–300. Available from: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
  90. Baumann CK, Castiglione-Gertsch M. Estrogen receptor modulators and down regulators: Optimal use in postmenopausal women with breast cancer. *Drugs*. 2007.
  91. Patel HK, Bihani T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacology and Therapeutics*. 2018.
  92. Beatson GT. ON THE TREATMENT OF INOPERABLE CASES OF CARCINOMA OF THE MAMMA: SUGGESTIONS FOR A NEW METHOD OF TREATMENT, WITH ILLUSTRATIVE CASES.1. *Lancet*. 1896;
  93. Couto JP, Bentires-Alj M. Mouse models of breast cancer: Deceptions that reveal the truth. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management*. 2017.
  94. Nilsson S, Koehler KF, Gustafsson JÅ. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011.
  95. Jordan VC. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nature Reviews Cancer*. 2007.
  96. Pickar JH, MacNeil T, Ohleth K. SERMs: Progress and future perspectives. *Maturitas*. 2010.
  97. Powles TJ, Hickish T, Kanis JA, Tidy A, Ashley S. Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy x-ray absorptiometry in healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol*. 1996;
  98. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronin WM, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst*. 1998;
  99. MacGregor JI, Jordan VC. Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*. 1998 Jun;50(2):151–96.
  100. Harper MJ, Walpole AL. Mode of action of I.C.I. 46,474 in preventing implantation in rats. *J Endocrinol*. 1967;
  101. Harper MJ, Walpole AL. A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J Reprod Fertil*. 1967;
  102. Shagufta, Ahmad I. Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. Vol. 143, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS; 2018. p. 515–31.
  103. Lerner LJ, Holthaus FJ, Thompson CR. A non-steroidal estrogen antagonist 1-(p-2-diethylaminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-methoxyphenyl ethanol. *Endocrinology*. 1958;
  104. Geiser AG, Hummel CW, Draper MW, Henck JW, Cohen IR, Rudmann DG, et al. A new selective estrogen receptor modulator with potent uterine antagonist activity, agonist activity in bone, and minimal ovarian stimulation. *Endocrinology*. 2005;
  105. Massarweh S, Schiff R. Resistance to endocrine therapy in breast cancer: Exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. In: *Endocrine-Related Cancer*. 2006.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

106. Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance: Increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004;
107. Nwachukwu JC, Srinivasan S, Bruno NE, Parent AA, Hughes TS, Pollock JA, et al. Resveratrol modulates the inflammatory response via an estrogen receptor-signal integration network. *Elife.* 2014;2014(3).
108. Cauley JA, Norton L, Lippman ME, Eckert S, Krueger KA, Purdie DW, et al. Continued breast cancer risk reduction in postmenopausal women treated with raloxifene: 4-Year results from the MORE trial. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;
109. Komm BS, Mirkin S. An overview of current and emerging SERMs. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2014.
110. Long X, Nephew KP. Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- $\alpha$ . *J Biol Chem.* 2006;
111. Robertson JFR. ICI 182,780 (Fulvestrant<sup>TM</sup>) - The first oestrogen receptor down-regulator - Current clinical data. *Br J Cancer.* 2001;
112. Robertson JF. Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator--future possibilities in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001 Dec;79(1-5):209-12.
113. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A Potent Specific Pure Antiestrogen with Clinical Potential. *Cancer Res.* 1991;
114. Wakeling AE. The Potential for a Novel Pure Anti-Oestrogen. *Horm Res Paediatr* [Internet]. 1989;32(suppl 1(Suppl. 1):257-60. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000181359>
115. Addo S, Yates RA, Laight A. A phase I trial to assess the pharmacology of the new oestrogen receptor antagonist fulvestrant on the endometrium in healthy postmenopausal volunteers. *Br J Cancer.* 2002;
116. Coopman P, Garcia M, Br nner N, Derocq D, Clarke R, Rochefort H. Anti-proliferative and anti-estrogenic effects of ICI 164,384 and ICI 182,780 in 4-OH-tamoxifen-resistant human breast-cancer cells. *Int J Cancer.* 1994;
117. Giessrigl B, Schmidt WM, Kalipciyan M, Jeitler M, Bilban M, Gollinger M, et al. Fulvestrant induces resistance by modulating GPER and CDK6 expression: Implication of methyltransferases, deacetylases and the hSWI/SNF chromatin remodelling complex. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2751-62.
118. Liu J, Li J, Wang H, Wang Y, He Q, Xia X, et al. Clinical and genetic risk factors for Fulvestrant treatment in post-menopause ER-positive advanced breast cancer patients. *J Transl Med* [Internet]. 2019;17(1):1-13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1734-x>
119. Avenda o C, Men ndez JC. Chapter 3 - Anticancer Drugs That Modulate Hormone Action. In: Avenda o C, Men ndez JC, editors. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs (Second Edition)* [Internet]. Second Edi. Boston: Elsevier; 2015. p. 81-131. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044462649300003X>
120. de Vries Schultink AHM, Alexi X, van Werkhoven E, Madlensky L, Natarajan L, Flatt SW, et al. An Antiestrogenic Activity Score for tamoxifen and its metabolites is associated with breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;
121. Perez EA, Weilbaecher K. Aromatase inhibitors and bone loss. *Oncology (Williston Park).* 2006 Aug;20(9):1029-1040,1042,1048.
122. Scaltriti M. Breast cancer genomics. In: *Breast Cancer: Innovations in Research and Management.* 2017.
123. O'Regan RM, Jordan VC. Tamoxifen to raloxifene and beyond. *Semin Oncol.* 2001;
124. Arun B, Anthony M, Dunn B. The search for the ideal SERM. *Expert Opinion on*

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Pharmacotherapy. 2002.
125. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 2016.
  126. Swinney DC. Phenotypic vs. Target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;93(4):299–301.
  127. Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science (80- )*. 2009;325(5937):161–5.
  128. Eder J, Herrling PL. Trends in Modern Drug Discovery. *Handb Exp Pharmacol*. 2016;232:3–22.
  129. Haasen D, Schopfer U, Antczak C, Guy C, Fuchs F, Selzer P. How Phenotypic Screening Influenced Drug Discovery: Lessons from Five Years of Practice. *Assay Drug Dev Technol*. 2017;15(6):239–46.
  130. Isgut M, Rao M, Yang C, Subrahmanyam V, Rida PCG, Aneja R. Application of Combination High-Throughput Phenotypic Screening and Target Identification Methods for the Discovery of Natural Product-Based Combination Drugs. *Med Res Rev*. 2018;38(2):504–24.
  131. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: An industry perspective. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2017;16(8):531–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.111>
  132. Mullard A. 2020 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2021;20(2):85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/d41573-021-00002-0>
  133. Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ Quim [Internet]*. 2017;28(1):51–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2016.06.002>
  134. Robuck PR, Wurzelmann JI, Merrick M. Understanding the drug development process. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11(SUPPL. 1):13–6.
  135. Berdigaliyev N, Aljofan M. An overview of drug discovery and development. *Future Med Chem*. 2020;12(10):939–47.
  136. Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery-past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;
  137. Zheng W, Thorne N, McKew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2013.
  138. Heilker R, Lessel U, Bischoff D. The power of combining phenotypic and target-focused drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2019.
  139. Croston GE. The utility of target-based discovery. *Expert Opin Drug Discov [Internet]*. 2017;12(5):427–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2017.1308351>
  140. Mann J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer [Internet]*. 2002;2(2):143–8. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrc723>
  141. Langdon SR, Brown N, Blagg J. Scaffold diversity of exemplified medicinal chemistry space. *J Chem Inf Model*. 2011;
  142. Lachance H, Wetzel S, Kumar K, Waldmann H. Charting, navigating, and populating natural product chemical space for drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2012.
  143. Aranda-Tavío H. Descubrimiento y evaluación preclínica de nuevas entidades químicas bio inspiradas con actividad antitumoral en neoplasias hematológicas. Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2022.
  144. Priscila L, Amesty Á, Guerra-rodr M, Brito-casillas Y, Guerra B, Fern L, et al. Design , Semisynthesis , and Estrogenic Activity of Lignan Derivatives from Natural Dibenzylbutyrolactones †. 2022;

## VII. BIBLIOGRAFÍA

145. Hernández-Molina R, Abramov PA, González-Platas J, Oramas-Royo S, Estévez-Braun A, Guerra-Rodríguez M, et al. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol. *Polyhedron*. 2019;165:73–8.
146. Guerra B, Martín-Rodríguez P, Díaz-Chico JC, McNaughton-Smith G, Jiménez-Alonso S, Hueso-Falcón I, et al. CM363, a novel naphthoquinone derivative which acts as multikinase modulator and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2017 May 2 [cited 2018 Mar 8];8(18):29679–98. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11425>
147. Aranda-Tavío H, Recio C, Martín-Acosta P, Guerra-Rodríguez M, Brito-Casillas Y, Blanco R, et al. JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;144:112330. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221011148>
148. Martín-Acosta P, Amesty Á, Guerra-Rodríguez M, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. Modular synthesis and antiproliferative activity of new dihydro-1H-pyrazolo[1,3-b]pyridine embelin derivatives. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10).
149. Marrero-Alonso J, Morales A, García Marrero B, Boto A, Marín R, Cury D, et al. Unique SERM-like properties of the novel fluorescent tamoxifen derivative FLTX1. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;
150. Morales A, Marín R, Marrero-Alonso J, Boto A, Díaz M. Colocalization of estrogen receptors with the fluorescent tamoxifen derivative, FLTX1, analyzed by confocal microscopy. In: *Methods in Molecular Biology*. 2016.
151. Oh S, Park SB. A design strategy for drug-like polyheterocycles with privileged substructures for discovery of specific small-molecule modulators. *Chem Commun*. 2011;47(48):12754–61.
152. Basua S, Ellinger B, Rizzo S, Deraeve C, Schürmann M, Preutb H, et al. Biology-oriented synthesis of a natural-product inspired oxepane collection yields a small-molecule activator of the Wnt-pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(17):6805–10.
153. Tietze LF, Brasche G, Gericke KM. Domino Reactions in Organic Synthesis. *Domino React Org Synth*. 2006;1–617.
154. Rotstein BH, Zaretsky S, Rai V, Yudin AK. Small heterocycles in multicomponent reactions. *Chem Rev*. 2014;114(16):8323–59.
155. Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. *Curr Comput Aid Dru Des* [Internet]. 2011;7(2):146–57. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cad/2011/00000007/00000002/art00008%0Ahttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
156. Boström J, Brown DG, Young RJ, Keserti GM. Expanding the medicinal chemistry synthetic toolbox. Vol. 17, *Nature reviews. Drug discovery*. England; 2018. p. 922.
157. Barnes EC, Kumar R, Davis RA. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. *Natural Product Reports*. 2016.
158. Martín-Acosta P, Amesty Á, Guerra-Rodríguez M, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. Modular synthesis and antiproliferative activity of new dihydro-1H-pyrazolo[1,3-b]pyridine embelin derivatives. *Pharmaceuticals*. 2021;14(10):1–34.
159. Chitra M, Sukumar E, Suja V, Devi CS. Antitumor, anti-inflammatory and analgesic property of embelin, a plant product. *Chemotherapy*. 1994;40(2):109–13.
160. Marshall KM, Barrows LR. Biological activities of pyridoacridines. *Nat Prod Rep* [Internet]. 2004;21(6):731–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/B401662A>
161. Faria JV, Vegi PF, Miguita AGC, Dos Santos MS, Boechat N, Bernardino AMR. Recently

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- reported biological activities of pyrazole compounds. *Bioorg Med Chem*. 2017 Nov;25(21):5891–903.
162. Eldehna WM, El-Naggar DH, Hamed AR, Ibrahim HS, Ghabbour HA, Abdel-Aziz HA. One-pot three-component synthesis of novel spirooxindoles with potential cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. 2018;33(1):309–18. Available from: <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1417276>
  163. Turek M, Szczesna D, Koprowski M, Balczewski P. Synthesis of 1-indanones with a broad range of biological activity. *Beilstein J Org Chem*. 2017;13(Figure 1):451–94.
  164. Narayanan S, Gupta P, Nazim U, Ali M, Karadkhelkar N, Ahmad M, et al. Anti-cancer effect of Indanone-based thiazolyl hydrazone derivative on colon cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2019;110(January):21–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.004>
  165. Top S, Vessières A, Cabestaing C, Laïos I, Leclercq G, Provot C, et al. Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators. (SERMs) Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series. *J Organomet Chem*. 2001;637:500–6.
  166. Salustiano EJS, Netto CD, Fernandes RF, Da Silva AJM, Bacelar TS, Castro CP, et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol,  $\alpha$ -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest New Drugs*. 2010;28(2):139–44.
  167. Kandioller W, Balsano E, Meier SM, Jungwirth U, Göschl S, Roller A, et al. Organometallic anticancer complexes of lapachol: Metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity. *Chem Commun*. 2013;
  168. Babula P, Adam V, Havel L, Kizek R. [Naphthoquinones and their pharmacological properties]. *Ces a Slov Farm Cas Ces Farm Spol a Slov Farm Spol*. 2007 Jun;56(3):114–20.
  169. Martín-Acosta P. Síntesis Dominó de Compuestos Quinónicos con Potencial Actividad frente a Dianas de Interés Farmacológico. Universidad de la Laguna; 2019.
  170. Martín-Rodríguez P, Guerra B, Hueso-Falcón I, Aranda-Tavío H, Díaz-Chico J, Quintana J, et al. A Novel Naphthoquinone-Coumarin Hybrid That Inhibits BCR-ABL1-STAT5 Oncogenic Pathway and Reduces Survival in Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells. *Front Pharmacol* [Internet]. 2019;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01546>
  171. Jiménez-Alonso S, Guasch J, Estévez-Braun A, Ratera I, Veciana J, Ravelo AG. Electronic and Cytotoxic Properties of 2-Amino-naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones. *J Org Chem* [Internet]. 2011 Mar 18;76(6):1634–43. Available from: <https://doi.org/10.1021/jo102233j>
  172. Oramas-Royo S, Torrejón C, Cuadrado I, Hernández-Molina R, Hortelano S, Estévez-Braun A, et al. Synthesis and cytotoxic activity of metallic complexes of lawsone. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2013;21(9):2471–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808961300196X>
  173. Clark JD, Flanagan ME, Telliez J-B. Discovery and development of Janus kinase (JAK) inhibitors for inflammatory diseases. *J Med Chem*. 2014 Jun;57(12):5023–38.
  174. Pilżys T, Marcinkowski M, Kukwa W, Garbicz D, Dylewska M, Ferenc K, et al. ALKBH overexpression in head and neck cancer: potential target for novel anticancer therapy. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–16.
  175. Jelassi B, Anachelin M, Chamouton J, Cayuela ML, Clarysse L, Li J, et al. Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis* [Internet]. 2013;34(7):1487–96. Available from: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt099>
  176. Cañeque T, Gomes F, Mai TT, Maestri G, Malacria M, Rodriguez R. Synthesis of marmycin A and investigation into its cellular activity. *Nat Chem* [Internet]. 2015;7(9):744–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.2302>
  177. BECKER EL, FABING HD, HAWKINS JR. Presidon; a new sedative-hypnotic. *Christ Hosp Med Bull*. 1949 Apr;2(4):80–4.



## VII. BIBLIOGRAFÍA

178. Pribilla O. Zur Toxikologie des „Persedons“. Arch Toxikol [Internet]. 1956;16(1):34–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00577351>
179. Shigemizu D, Hu Z, Hung J-H, Huang C-L, Wang Y, DeLisi C. Using functional signatures to identify repositioned drugs for breast, myelogenous leukemia and prostate cancer. PLoS Comput Biol. 2012 Feb;8(2):e1002347.
180. Matiadis D, Sagnou M. Pyrazoline Hybrids as Promising Anticancer Agents: An Up-to-Date Overview. Int J Mol Sci. 2020 Jul;21(15).
181. Stauffer SR, Coletta CJ, Tedesco R, Nishiguchi G, Carlson KE, Sun J, et al. Pyrazole Ligands: Structure–Affinity/Activity Relationships and Estrogen Receptor- $\alpha$ -Selective Agonists. J Med Chem [Internet]. 2000;43(26):4934–47. Available from: <https://lens.org/028-314-190-309-920>
182. Teponno RB, Kusari S, Spitteller M. Recent advances in research on lignans and neolignans. Nat Prod Rep [Internet]. 2016;33(9):1044–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C6NP00021E>
183. Mesa-Siverio D, Machín RP, Estévez-Braun A, Ravelo ÁG, Lock O. Structure and estrogenic activity of new lignans from *Iryanthera lancifolia*. Bioorg Med Chem [Internet]. 2008;16(6):3387–94. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808960701053X>
184. Gein VL, Vychezhnanina VN, Levandovskaya EB, Syropyatov BY, Vakhrin MI, Voronina E V., et al. Synthesis and antibacterial and analgesic activity of 5-aryl-4-acyl-3-hydroxy-1(2,2-dimethoxyethyl)-3-pyrrolin-2-ones. Pharm Chem J. 2010;44(7):370–3.
185. Bosch J, Roca T, Catena JL, Llorens O, Pérez JJ, Lagunas C, et al. Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-triaryl-3-pyrrolin-2-ones, a new class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 2000 Aug;10(15):1745–8.
186. Mowery P, Banales Mejia F, Franceschi CL, Kean MH, Kwansare DO, Lafferty MM, et al. Synthesis and evaluation of the anti-proliferative activity of diaryl-3-pyrrolin-2-ones and fused analogs. Bioorg Med Chem Lett [Internet]. 2017;27(2):191–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09680894X16312422>
187. Guedes G, Amesty Á, Jiménez-Monzón R, Marrero-Alonso J, Díaz M, Fernández-Pérez L, et al. Synthesis of 4,4'-Diaminotriphenylmethanes with Potential Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM)-like Activity. ChemMedChem. 2015;
188. Makar S, Saha T, Swetha R, Gutti G, Kumar A, Singh SK. Rational approaches of drug design for the development of selective estrogen receptor modulators (SERMs), implicated in breast cancer. Bioorg Chem. 2020 Jan;94:103380.
189. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 1968;1968;97:77.
190. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Brenz R, Russo J, Pauley RJ, et al. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. Cancer Res. 1990;50(18):6075–86.
191. Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. Methods [Internet]. 2003;30(3):256–68. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104620230300032X>
192. Okada N, Kitano Y, Ichihara K. Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. J Invest Dermatol [Internet]. 1982;79(1):42–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12510580>
193. Enhancing Drug Discovery and Development - National Cancer Institute [Internet]. National Cancer Institute. 2015. Available from: <https://www.cancer.gov/research/areas/treatment/enhancing-drug-discovery>

## VII. BIBLIOGRAFÍA

194. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983;65(1–2):55–63.
195. Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol Sci*. 2002;66(1).
196. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May;72:248–54.
197. Recio C, Aranda-Tavío H, Guerra Rodríguez M, Mirecki-Garrido M, Martín-Rodríguez P, Guerra B, et al. JAK, an Oncokinase in Hematological Cancer. In 2019.
198. Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol*. 2004 Dec;1(4):337–41.
199. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar;46(1–3):3–26.
200. Robert B, International CD, Incucyte A, Bioscience E, Hospital W, Amsbio, et al. 96-Well Kinetic 3D Spheroid Protocol. *Co Rep*. 2016;
201. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc*. 2009;4(3):309–24.
202. Soto AM, Lin TM, Justicia H, Silvia RM, Sonnenschein C. An “in culture” bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (e-screen). In: *Advances in modern environmental toxicology Vol XXI*. 1992.
203. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea Serrano F. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. In: *Environmental Health Perspectives*. 1995.
204. Simões MG, Urstöger G, Schennach R, Hirn U. Quantification and Imaging of Nanoscale Contact with Förster Resonance Energy Transfer. *ACS Appl Mater Interfaces* [Internet]. 2021 Apr 28;13(16):19521–9. Available from: <https://doi.org/10.1021/acsami.1c04226>
205. Zhang X, Hu Y, Yang X, Tang Y, Han S, Kang A, et al. Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosens Bioelectron*. 2019 Aug;138:111314.
206. Johnson SM, Maleki-Dizaji M, Styles JA, White INH. Ishikawa cells exhibit differential gene expression profiles in response to oestradiol or 4-hydroxytamoxifen. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):337–50.
207. Bhat KPL, Pezzuto JM. Resveratrol Exhibits Cytostatic and Antiestrogenic Properties with Human Endometrial Adenocarcinoma (Ishikawa) Cells 1. Vol. 61, *CANCER RESEARCH*. 2001.
208. Wober J, Weißwange I, Vollmer G. Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens. Vol. 83, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2003.
209. Kozak J, Wdowiak P, Maciejewski R, Torres A. A guide for endometrial cancer cell lines functional assays using the measurements of electronic impedance. *Cytotechnology*. 2018;
210. Akada H, Akada S, Gajra A, Bair A, Graziano S, Hutchison RE, et al. Efficacy of vorinostat in a murine model of polycythemia vera. *Blood*. 2012 Apr;119(16):3779–89.
211. Verde G, De Llobet LI, Wright RHG, Quilez J, Peiró S, Le Dily F, et al. Unliganded Progesterone Receptor Governs Estrogen Receptor Gene Expression by Regulating DNA Methylation in Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)*. 2018 Oct;10(10).
212. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2012;13(1):134. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## VII. BIBLIOGRAFÍA

213. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
214. Muñoz Descalzo S, Rué P, Faunes F, Hayward P, Jakt LM, Balayo T, et al. A competitive protein interaction network buffers Oct4-mediated differentiation to promote pluripotency in embryonic stem cells. *Mol Syst Biol.* 2013 Oct;9:694.
215. Lou X, Kang M, Xenopoulos P, Muñoz-Descalzo S, Hadjantonakis A-K. A rapid and efficient 2D/3D nuclear segmentation method for analysis of early mouse embryo and stem cell image data. *Stem cell reports.* 2014 Mar;2(3):382–97.
216. Chou T-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* 2010 Jan;70(2):440–6.
217. Abel R, Mondal S, Masse C, Greenwood J, Harriman G, Ashwell MA, et al. Accelerating drug discovery through tight integration of expert molecular design and predictive scoring. *Curr Opin Struct Biol.* 2017 Apr;43:38–44.
218. Lewis-Wambi JS, Kim H, Curpan R, Grigg R, Sarker MA, Jordan VC. The selective estrogen receptor modulator bazedoxifene inhibits hormone-independent breast cancer cell growth and down-regulates estrogen receptor  $\alpha$  and cyclin D1. *Mol Pharmacol.* 2011 Oct;80(4):610–20.
219. Yeh W-L, Shioda K, Coser KR, Rivizzigno D, McSweeney KR, Shioda T. Fulvestrant-induced cell death and proteasomal degradation of estrogen receptor  $\alpha$  protein in MCF-7 cells require the CSK c-Src tyrosine kinase. *PLoS One.* 2013;8(4):e60889.
220. Jordan VC. Tamoxifen: toxicities and drug resistance during the treatment and prevention of breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:195–211.
221. Lisboa T, Silva D, Duarte S, Ferreira R, Andrade C, Lopes AL, et al. Toxicity and Antitumor Activity of a Thiophene-Acridine Hybrid. *Molecules.* 2019 Dec;25(1).
222. Bouhenna MM, Orlikova B, Talhi O, Schram B, Pinto DCGA, Taibi N, et al. Anti-proliferative, Cytotoxic and NF- $\kappa$ B Inhibitory Properties of Spiro(Lactone-Cyclohexanone) Compounds in Human Leukemia. *Anticancer Res.* 2017 Sep;37(9):5225–33.
223. Silva EO, Ruano-González, Santos RA dos, Sánchez-Maestre R, Furtado, Niedege AJC, Collado IG., et al. Antifungal and Cytotoxic Assessment of Lapachol Derivatives Produced by Fungal Biotransformation. *Nat Prod Commun.* 2016;
224. Vessières A, Top S, Beck W, Hillard E, Jaouen G. Metal complex SERMs (selective oestrogen receptor modulators). The influence of different metal units on breast cancer cell antiproliferative effects. *Dalton Trans.* 2006 Jan;(4):529–41.
225. Popolin CP, Reis JPB, Becceneri AB, Graminha AE, Almeida MAP, Corrêa RS, et al. Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells. *PLoS One.* 2017;12(9):e0183275.
226. Elshemy HAH, Zaki MA. Design and synthesis of new coumarin hybrids and insight into their mode of antiproliferative action. *Bioorganic Med Chem.* 2017;25(3):1066–75.
227. Yao D, Pan D, Zhen Y, Huang J, Wang J, Zhang J, et al. Ferulin C triggers potent PAK1 and p21-mediated anti-tumor effects in breast cancer by inhibiting Tubulin polymerization in vitro and in vivo. *Pharmacol Res [Internet].* 2020;152:104605. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661819320869>
228. Yang R-M, Zhang X-L, Wang L, Huang J-P, Yang J, Yan Y-J, et al.  $\alpha$ -Pyrone Derivatives from a Streptomyces Strain Resensitize Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells. *Nat Products Bioprospect.* 2017 Aug;7(4):329–34.
229. Yang Y, Gao W, Tao S, Wang Y, Niu J, Zhao P, et al. ER-mediated anti-tumor effects of shikonin on breast cancer. *Eur J Pharmacol [Internet].* 2019;863:172667. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299919306193>
230. Malik MS, Alsantali RI, Jassas RS, Alsimaree AA, Syed R, Alsharif MA, et al. Journey of anthraquinones as anticancer agents – a systematic review of recent literature. *RSC Adv*

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- [Internet]. 2021;11(57):35806–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/D1RA05686G>
231. Bai J, Wu J, Tang R, Sun C, Ji J, Yin Z, et al. Emodin , a natural anthraquinone , suppresses liver cancer in vitro and in vivo by regulating VEGFR 2 and miR-34a. 2020;229–45.
  232. Martin GDA, Tan LT, Jensen PR, Dimayuga RE, Fairchild CR, Raventos-Suarez C, et al. Marmycins A and B, Cytotoxic Pentacyclic C-Glycosides from a Marine Sediment-Derived Actinomycete Related to the Genus Streptomyces. *J Nat Prod* [Internet]. 2007 Sep 1;70(9):1406–9. Available from: <https://doi.org/10.1021/np060621r>
  233. Ismail MMF, Farrag AM, Harras MF. Novel 1,3,4-Triaryl Pyrazoles: Synthesis, QSAR Studies and Cytotoxicity against Breast Cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2019;19(7):948–59.
  234. Majdalawieh AF, Mansour ZR. Sesamol, a major lignan in sesame seeds (*Sesamum indicum*): Anti-cancer properties and mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2019 Jul;855:75–89.
  235. Joksimović N, Petronijević J, Janković N, Baskić D, Popović S, Todorović D, et al. Synthesis, characterization, anticancer evaluation and mechanisms of cytotoxic activity of novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment: DNA, BSA interactions and molecular docking study. *Bioorg Chem* [Internet]. 2019;88:102954. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206819301403>
  236. Jung E-K, Leung E, Barker D. Synthesis and biological activity of pyrrole analogues of combretastatin A-4. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2016;26(13):3001–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X1630511X>
  237. Yadav Y, MacLean ED, Bhattacharyya A, Parmar VS, Balzarini J, Barden CJ, et al. Design, synthesis and bioevaluation of novel candidate selective estrogen receptor modulators. *Eur J Med Chem*. 2011;
  238. Joseph JD, Darimont B, Zhou W, Arrazate A, Young A, Ingalla E, et al. The selective estrogen receptor downregulator GDC-0810 is efficacious in diverse models of ER+ breast cancer. *Elife*. 2016 Jul;5.
  239. Wei L, Lu GY. Synthesis of Diaryl Pyrrolones Derivatives as Combretastatin A-4. In: *Advances in Materials and Materials Processing*. Trans Tech Publications Ltd; 2013. p. 689–92. (Advanced Materials Research; vol. 652).
  240. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006 Dec;10(6):515–27.
  241. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131285.
  242. Lawrence RT, Perez EM, Hernández D, Miller CP, Haas KM, Irie HY, et al. The proteomic landscape of triple-negative breast cancer. *Cell Rep*. 2015 Apr;11(4):630–44.
  243. Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 2004 Apr;23(8):1739–48.
  244. Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J, et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One*. 2009 Jul;4(7):e6146.
  245. Siersbæk R, Scabia V, Nagarajan S, Chernukhin I, Papachristou EK, Broome R, et al. IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor  $\alpha$  Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell* [Internet]. 2020;38(3):412–423.e9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1535610820303111>
  246. Yamashita H, Iwase H. The role of Stat5 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer*. 2002;9(4):312–8.
  247. Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, et al. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target



## VII. BIBLIOGRAFÍA

- validation and drug evaluation. *BMC Biol.* 2012;
248. Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Sep;5(9):730–9.
  249. Lonsdale R, Ward RA. Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chem Soc Rev* [Internet]. 2018;47(11):3816–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C7CS00220C>
  250. Kajstura M, Halicka HD, Pryjma J, Darzynkiewicz Z. Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytom Part A J Int Soc Anal Cytol.* 2007 Mar;71(3):125–31.
  251. Parker MG. Action of “pure” antiestrogens in inhibiting estrogen receptor action. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 1993;26(2):131–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00689686>
  252. Guan J, Zhou W, Hafner M, Blake RA, Chalouni C, Chen IP, et al. Therapeutic Ligands Antagonize Estrogen Receptor Function by Impairing Its Mobility. *Cell.* 2019 Aug;178(4):949-963.e18.
  253. Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol.* 2001 Aug;8(8):739–58.
  254. Buache E, Etique N, Alpy F, Stoll I, Muckensturm M, Reina-San-Martin B, et al. Deficiency in trefoil factor 1 (TFF1) increases tumorigenicity of human breast cancer cells and mammary tumor development in TFF1-knockout mice. *Oncogene.* 2011 Jul;30(29):3261–73.
  255. Ribieras S, Tomasetto C, Rio MC. The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Aug;1378(1):F61-77.
  256. Wardell SE, Marks JR, McDonnell DP. The turnover of estrogen receptor  $\alpha$  by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy. *Biochem Pharmacol.* 2011 Jul;82(2):122–30.
  257. Hisamatsu Y, Tokunaga E, Yamashita N, Akiyoshi S, Okada S, Nakashima Y, et al. Impact of GATA-3 and FOXA1 expression in patients with hormone receptor-positive/HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer.* 2015 Sep;22(5):520–8.
  258. Wang F, Samudio I, Safe S. Transcriptional activation of rat creatine kinase B by 17 $\beta$ -estradiol in MCF-7 cells involves an estrogen responsive element and GC-rich sites. *J Cell Biochem.* 2001;84(1):156–72.
  259. Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurside E. Responses to estradiol in a human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Steroid Biochem.* 1986 Jan;24(1):85–9.
  260. Neven P, Vergote I. Tamoxifen, screening and new oestrogen receptor modulators. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2001 Jun;15(3):365–80.
  261. Jamil A, Croxtall JD, White JO. The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells (Ishikawa). *J Mol Endocrinol.* 1991 Jun;6(3):215–21.
  262. Guerra-Rodríguez M, López-Rojas P, Amesty Á, Aranda-Tavío H, Brito-Casillas Y, Estévez-Braun A, et al. Discovery of Highly-Functionalized 5-Hydroxy- 2*H*-Pyrrol-2-Ones that Exhibit Antiestrogenic Effects in Breast and Endometrial Cancer Cells and Potentiate the Antitumoral Effect of Tamoxifen. *SSRN Electron J.* 2022.
  263. Mohibi S, Mirza S, Band H, Band V. Mouse models of estrogen receptor-positive breast cancer. *J Carcinog.* 2011;10:35.
  264. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia.* 1968 Sep;13(3):222–57.
  265. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents [Internet]. OECD; 2018 [cited 2022 Jul 22]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: <https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study->

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- in-rodents\_9789264070707-en
266. Dorfman RI. *Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization*. Academic Press, editor. New York; 1962.
  267. Test No. 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents [Internet]. OECD; 2007 [cited 2022 Jul 22]. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). Available from: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-440-uterotrophic-bioassay-in-rodents\\_9789264067417-en](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-440-uterotrophic-bioassay-in-rodents_9789264067417-en)
  268. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May;81(3):323–30.
  269. Lee JH, Sung JY, Choi EK, Yoon H-K, Kang BR, Hong EK, et al. C/EBP $\beta$  Is a Transcriptional Regulator of Wee1 at the G<sub>2</sub>/M Phase of the Cell Cycle. *Cells*. 2019 Feb;8(2).
  270. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997 Nov;106(6):348–60.
  271. Katayama K, Fujita N, Tsuruo T. Akt/protein kinase B-dependent phosphorylation and inactivation of WEE1Hu promote cell cycle progression at G2/M transition. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul;25(13):5725–37.
  272. de Gooijer MC, van den Top A, Bockaj I, Beijnen JH, Würdinger T, van Tellingen O. The G2 checkpoint—a node-based molecular switch. *FEBS Open Bio*. 2017 Apr;7(4):439–55.
  273. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol*. 2001 Jul;21(13):4129–39.
  274. Pawlik A, Słomińska-Wojewódzka M, Herman-Antosiewicz A. Sensitization of estrogen receptor-positive breast cancer cell lines to 4-hydroxytamoxifen by isothiocyanates present in cruciferous plants. *Eur J Nutr*. 2016 Apr;55(3):1165–80.
  275. Campbell KJ, Mason SM, Winder ML, Willemsen RBE, Cloix C, Lawson H, et al. Breast cancer dependence on MCL-1 is due to its canonical anti-apoptotic function. *Cell Death Differ* [Internet]. 2021;28(9):2589–600. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00773-4>
  276. Young AIJ, Law AMK, Castillo L, Chong S, Cullen HD, Koehler M, et al. MCL-1 inhibition provides a new way to suppress breast cancer metastasis and increase sensitivity to dasatinib. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2016;18(1):125. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0781-6>
  277. Yamnik RL, Digilova A, Davis DC, Brodt ZN, Murphy CJ, Holz MK. S6 kinase 1 regulates estrogen receptor alpha in control of breast cancer cell proliferation. *J Biol Chem*. 2009 Mar;284(10):6361–9.
  278. Nass N, Kalinski T. Tamoxifen resistance: from cell culture experiments towards novel biomarkers. *Pathol Res Pract*. 2015 Mar;211(3):189–97.
  279. Roarty K, Echeverria G V. Laboratory Models for Investigating Breast Cancer Therapy Resistance and Metastasis. *Front Oncol*. 2021;11:645698.
  280. Price S, Bender SG, Yahn R, Till NA, Varady S, LaLonde RL. Searching for an ideal SERM: Mining tamoxifen structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem Lett*. 2021 Nov;52:128383.



# VIII. ANEXO I. FINANCIACIÓN

---





## VIII. ANEXO I. FINANCIACIÓN

El desarrollo del presente trabajo de investigación que culmina en la defensa de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación procedente de:

### ➤ **Proyectos competitivos nacionales**

1. Sociedad Española de Diabetes. XII Ayuda SED a Proyectos de Investigación Básica en Diabetes dirigidos por Jóvenes Investigadores. “Modulación de mecanismos inmunoinflamatorios implicados en el daño vascular asociado a diabetes. Sociedad Española de Diabetes (SED)”. IP: Carlota Recio (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (ULPGC – IUIBS – BIOPharm)). 2022-2022.
2. Ministerio Español de Economía y Competitividad (MINECO). Retos Investigación. “Búsqueda e identificación de nuevas moléculas moduladoras de dianas terapéuticas en cáncer”. RTI2018–094356-B-C21. IP: Ana Estévez-Braun (Instituto Universitario de Bio-Orgánica (ULL – IUBO – QUIBIONAT)). 2019 - 2022.
3. Ministerio Español de Economía y Competitividad cofinanciado por el Fondo Europeo para el Desarrollo Regional (MINECO-FEDER). “Desarrollo preclínico de nuevas estructuras bioactivas moduladoras de las actividades oncogénicas de STAT3/5 o de los Receptores de Estrógenos”. SAF2015-65113-C2-2, SAF 2015–65113-C2–1-R. IP: Leandro Fernández Pérez (ULPGC – IUIBS – BIOPharm) y Ana Estévez Braun (Instituto Universitario de Biorgánica (ULL – IUBO - QUIBIONAT)). Proyecto coordinado. 2016 - 2019.

### ➤ **Proyectos competitivos regionales**

1. Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. ProID2021010037. Búsqueda, síntesis y evaluación preclínica de nuevas moléculas moduladoras de la ruta JAK/STAT como agentes antitumorales y/o antiinflamatorios. Instituto Universitario de Biorgánica (IUBO - QUIBIONAT) de la Universidad de La Laguna con participación de los investigadores del grupo BIOPharm del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (ULPGC – IUIBS – BIOPharm). IP: Ana Estévez Braun (ULL – IUBO – QUIBIONAT). 2021 - 2023.

## VIII. ANEXO I. FINANCIACIÓN

2. Premios a la investigación Biomédica Fundación DISA 2019. Evaluación de la proteína SOCS2 en la patogénesis del carcinoma hepatocelular y su papel como biomarcador en humanos. IP: Carlota Recio (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS – ULPGC – BIOPharm)). 2020-2021.
3. Proyecto Convocatoria Precompetitiva propia de la ULPGC. Evaluación de la proteína SOCS2 en la patogénesis del carcinoma hepatocelular y de su papel como diana terapéutica. IP: Carlota Recio (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS – ULPGC – BIOPharm)). 2020 - 2021.
4. Proyecto Convocatoria Precompetitiva propia de la ULPGC. Reposicionamiento de las estatinas lipofílicas en el tratamiento de la leucemia linfocítica aguda: sinergismo con los inhibidores de la dihidrofolato reductasa. IP: Mercedes De Mirecki Garrido (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS – ULPGC – BIOPharm)). 2019-2020.
5. Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. CEI2019–08/ACIISI. Cribado farmacológico de librerías químicas y desarrollo preclínico de nuevas entidades moduladoras de los oncogenes STAT3/5 y YAP1, y del receptor de estrógenos (SERM). IP: Leandro Fernández-Pérez (IP1) y C. Borja Guerra Hdez. (IP2) (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS – ULPGC – BIOPharm)). IP: Borja Guerra Hernández. (ULPGC – IUIBS – BIOPharm). 2020 - 2020.
6. Agencia Canaria de Investigación Innovación y Sociedad de la Información del Gobierno de Canarias. CEI2018–23/ACIISI. Aplicación de una plataforma de Bioensayos en el cribado de bibliotecas químicas inspiradas en la biodiversidad: identificación y desarrollo de moléculas con interés biomédico en oncología. IP: C. Borja Guerra Hdez. (Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS – ULPGC – BIOPharm)). 2019 - 2019.

### ➤ **Convenios con fundaciones**

1. Fundación “Alfredo Martín Reyes” (Arehucas) - Fundación del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (FICIC). Grupo BIOPharm del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS-ULPGC).

➤ **Becas y Ayudas:**

1. Beca predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) Convocatoria: 2016. Referencia de la ayuda: FPU16/00233. Beneficiario: Miguel Alfonso Guerra Rodríguez. Período: octubre 2017 – octubre 2021.
2. Prórroga de la beca predoctoral vinculada a la emergencia sanitaria causada por el coronavirus Covid-19. Ampliación de la beca predoctoral del programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD). Convocatoria: 2016. Referencia de la ayuda: FPU16/00233. Beneficiario: Miguel Alfonso Guerra Rodríguez. Período de Prórroga: octubre 2021 – marzo 2022.
3. Ayuda Erasmus+ Prácticas (SMT) de la ULPGC para Estancia de Formación en el laboratorio del Dr. Asif Iqbal en el *Institute of Cardiovascular Sciences*. University of Birmingham. Convocatoria 2019/2020. Beneficiario: Miguel Alfonso Guerra Rodríguez. Período: septiembre 2019 – diciembre 2019.





**IX. ANEXO II.**  
***CURRICULUM***  
***VITAE***

---



➤ **Formación académica**

- Graduado en Biología. Universidad de la Laguna – ULL (2015).
- Máster en Análisis Forense. Universidad del País Vasco – UPV – EHU (2016).

➤ **Artículos indexados en revistas científicas**

- **Guerra-Rodríguez M**, López-Rojas P, Aranda-Tavío H, Amesty A, Brito-Casillas Y, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B, Recio C. (9/1). 2022. Discovery of highly-functionalized 5-hydroxy-2H-pyrrol-2-ones that exhibit antiestrogenic effects in breast and endometrial cancer cells and potentiate the antitumoral effect of tamoxifen. *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers14215174>
- López-Rojas P, Amesty A, **Guerra-Rodríguez M**, Brito-Casillas Y, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. (7/1). 2022. Design, Semisynthesis, and Estrogenic Activity of Lignan Derivatives from Natural Dibenzylbutyrolactones. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph15050585>
- Aranda-Tavío H, Recio C, Martín-Acosta P, **Guerra-Rodríguez M**, Brito-Casillas Y, Blanco R, Junco V, León J, Montero JC, Gandullo-Sánchez L, McNaughton-Smith G, Zapata JM, Pandiella A, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B. (17/1). 2021. JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112330>
- Martín-Acosta P, Amesty A, **Guerra-Rodríguez M**, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. (7/1). 2021. Modular Synthesis and Antiproliferative Activity of New Dihydro-1H-pyrazolo[1,3-b]pyridine Embelin Derivatives. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph14101026>
- Guerra B, Recio C, Aranda-Tavío H, **Guerra-Rodríguez M**, García-Castellano JM, Fernández-Pérez L. (6/1). 2021. The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front. in Oncology*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.626971>
- Raucci F, Saviano A, Casillo G, **Guerra-Rodríguez M**, Mansour A, Piccolo ML, Ferraro M, Panza E, Vellecco V, Irace C, Caso F, Scarpa R, Mascolo N, Alfaifi M, Iqbal A, Maione F. (16/1). 2021. IL-17 induced inflammation modulates mPGES-1/PPAR- $\gamma$  pathway in monocytes/macrophages. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/bph.15413>



- Recio C, Guerra B, **Guerra-Rodríguez M**, Aranda Tavío H, Martín-Rodríguez P, Mirecki-Garrido M, Brito Casillas Y, Fernández-Pérez L. (8/1). 2019. Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncology. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0752-3>
- Hernández-Molina R, Abramov A, González-Platas J, Oramas-Royo S, Estévez-Braun A, **Guerra-Rodríguez M**, Aranda-Tavío H, Guerra B, Fernández-Pérez L. (9/1). 2019. Mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol. *Polyhedron*. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.03.010>
- Villaescusa P, Palencia L, Campaner M, Jauregui-Rada J, **Guerra-Rodríguez M**, Rocandio A, Pancorbo M. (7/1). 2018. Effective resolution of the Y chromosome sublineages of the Iberian haplogroup R1b-DF27 with forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00414>

#### ➤ **Capítulos de libro**

- Recio C, Aranda Tavío H, **Guerra-Rodríguez M**, Mirecki-Garrido M, Martín-Rodríguez P, Guerra B, Fernández-Pérez L (7/1). 2019. Chapter: JAK, an Oncokinase in Hematological Cancer. Published by IntechOpen. DOI: 10.5772/intechopen.84177. Book: Tyrosine Kinases as Druggable Targets in Cancer. ISBN: 978-1-78984-809-0.

#### ➤ **Aportaciones a Congresos Internacionales**

- **Guerra-Rodríguez M**, López-Rojas P, Amesty A, Recio C, Aranda-Tavío H, Rodrigo-González L, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B. 2020. “Pharmacological Screening of Brand-new Estrogen Receptor Modulators in Estrogen Receptor Positive (ER+) Breast Cancers”. 3rd conference of Junior Researchers of the Canary Islands and first International Conference of Youth People for Research. Vicerrectorado de Investigación, Transferencia y Campus Santa Cruz y Sur de la Universidad de La Laguna, **JINTE**. 27/11/2020, Tenerife, Spain.
- Aranda-Tavío H, Martín-Acosta P, Recio C, **Guerra-Rodríguez M**, Amesty A, Estévez-Braun A, Guerra B, Fernández-Pérez L. 2020. “A new naphthoquinone pyrone hybrid with antitumor activity against chronic and acute myeloid leukemia cells overcomes Imatinib resistance”. 3rd conference of Junior Researchers of the Canary Islands and first International Conference of Youth People for Research. Vicerrectorado de Investigación, Transferencia y Campus Santa Cruz y Sur de la Universidad de La Laguna, **JINTE**. 27/11/2020, Tenerife, Spain.
- López-Rojas P, Amesty A, **Guerra-Rodríguez M**, Aranda-Tavío H, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. 2019. “Highly functionalized pyrrolin-2-ones as Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)”. Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos. **IV QuimBioQuim**. 23-25 Oct 2019, Santiago de Compostela, Spain.

- Aranda-Tavío H, Martín-Rodríguez P, **Guerra-Rodríguez M**, Recio C, De Mirecki-Garrido M, Guerra B, Fernández-Pérez L. 2019. "Evaluation of JKST-6, a new naphthoquinone-pyrone dimer, as anticancer agent in BCR-ABL+, JAK2 mutated and FLT3 ITD+ Hematological Malignancies". The 15th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. **The Myelodysplastic Syndromes Foundation**. 8-11 May 2019, Copenhagen, Denmark.
- **Guerra-Rodríguez M**, Aranda-Tavío H, Martín-Rodríguez P, Recio C, De Mirecki-Garrido M, Martín-Acosta P, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L, Guerra B. 2018. "Pharmacological Screening of a Novel Chemical Library to find Novel Anti-Breast Cancer Agents". New Concepts in the Biology of Aggressive Breast Cancer Symposium - 6th International Inflammatory Breast Cancer Symposium. International Inflammatory Breast Cancer Symposium. **The IBC Network Foundation**. 20-21 Sept 2018, Madrid, Spain.
- Martín-Acosta P, Amesty A, Martín-Rodríguez P, **Guerra-Rodríguez M**, Aranda-Tavío H, Guerra B, Fernández-Pérez L, Estévez-Braun A. 2018. "Multicomponent synthesis of new cytotoxic dihydro-1hpyrazolo[1,3-b] pyridine embelin derivatives". EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry. **European Federation For Medicinal Chemistry and Chemical Biology (EFMC)**. 02/09/2018. Ljubljana, Slovenia.
- Martín-Rodríguez P, Guerra B, Hueso-Falcón I, Aranda-Tavío H, **Guerra-Rodríguez M**, Díaz-Chico J, Quintana J, Estévez F, Díaz-Chico N, Amesty A, Estévez-Braun A, Fernández-Pérez L. 2018. "Novel naphthoquinone-coumarin hybrids as inhibitors of BCR-ABL-STAT5 signaling pathway in Chronic Myelogenous Leukemia". First Meeting in Translational Pharmacology. 38<sup>th</sup> Spanish Society of Pharmacology meeting. 9<sup>th</sup> Spanish Society of Pharmacogenomics meeting. **Sociedad Española de Farmacología**. 19-22 Jun 2018, Santiago de Compostela, Spain. Publicado en: Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Aug;123 Suppl 2:3-96. doi: 10.1111/bcpt.13084.





## Article

# Discovery of Highly Functionalized 5-hydroxy-2H-pyrrol-2-ones That Exhibit Antiestrogenic Effects in Breast and Endometrial Cancer Cells and Potentiate the Antitumoral Effect of Tamoxifen

Miguel Guerra-Rodríguez <sup>1†</sup>, Priscila López-Rojas <sup>2†</sup>, Ángel Amesty <sup>2</sup>, Haidée Aranda-Tavío <sup>1</sup>, Yeray Brito-Casillas <sup>1</sup>, Ana Estévez-Braun <sup>2\*</sup>, Leandro Fernández-Pérez <sup>1</sup>, Borja Guerra <sup>1</sup> and Carlota Recio <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Paseo Blas Cabrera Felipe Físico s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González (IUBO AG), Universidad de La Laguna (ULL), Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Spain

\* Correspondence: aestebra@ull.edu.es (A.E.-B.); carlota.recio@ulpgc.es (C.R.)

† These authors contributed equally to this work.

**Citation:** Guerra-Rodríguez, M.; López-Rojas, P.; Amesty, Á.; Aranda-Tavío, H.; Brito-Casillas, Y.; Estévez-Braun, A.; Fernández-Pérez, L.; Guerra, B.; Recio, C. Discovery of Highly Functionalized 5-hydroxy-2H-pyrrol-2-ones That Exhibit Antiestrogenic Effects in Breast and Endometrial Cancer Cells and Potentiate the Antitumoral Effect of Tamoxifen. *Cancers* **2022**, *14*, 5174. <https://doi.org/10.3390/cancers14215174>

Academic Editor: John R. Hawse

Received: 2 October 2022

Accepted: 17 October 2022

Published: 22 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** About 70% of the breast tumors diagnosed are estrogen receptor (ER)-positive and depend on estrogens and the interactions with their ER to grow and survive; their therapeutic treatment has a good clinical prognosis and effectiveness, but antitumoral treatment resistances and undesirable side effects (ovarian cysts, endometrial cancer, or blood clots) remain clinically challenging. This justifies the development of new drugs that modulate ER activity since it is considered a clinically validated therapeutic target. The goal of this study was the identification and the pre-clinical pharmacological evaluation of new structures with antitumoral and/or antiestrogenic properties with alternative or complementary mechanisms of action to the endocrine therapy used in the gold-standard treatment of ER-positive breast cancer. Thus, we identified two leading compounds (highly-functionalized 5-hydroxy-2H-pyrrol-2-ones) with potential antitumoral effects and scarce estrogenic activity, which offers a pharmacological opportunity to progress in the study of ER-positive breast cancer treatment.




**Abstract:** Tamoxifen improves the overall survival rate in hormone receptor-positive breast cancer patients. However, despite the fact that it exerts antagonistic effects on the ER $\alpha$ , it can act as a partial agonist, resulting in tumor growth in estrogen-sensitive tissues. In this study, highly functionalized 5-hydroxy-2H-pyrrol-2-ones were synthesized and evaluated by using ER $\alpha$ - and phenotype-based screening assays. Compounds **32** and **35** inhibited 17 $\beta$ -estradiol (E2)-stimulated ER $\alpha$ -mediated transcription of the luciferase reporter gene in breast cancer cells without inhibition of the transcriptional activity mediated by androgen or glucocorticoid receptors. Compound **32** regulated E2-stimulated ER $\alpha$ -mediated transcription by partial antagonism, whereas compound **35** caused rapid and non-competitive inhibition. Monitoring of 2D and 3D cell growth confirmed potent antitumoral effects of both compounds on ER-positive breast cancer cells. Furthermore, compounds **32** and **35** caused apoptosis and blocked the cell cycle of ER-positive breast cancer cells in the sub-G1 and G0/G1 phases. Interestingly, compound **35** suppressed the functional activity of ER $\alpha$  in the uterus, as demonstrated by the inhibition of E2-stimulated transcription of estrogen and progesterone receptors and alkaline phosphatase enzymatic activity. Compound **35** showed a relatively low binding affinity with ER $\alpha$ . However, its antiestrogenic effect was associated with an increased polyubiquitination and a reduced protein expression of ER $\alpha$ . Clinically relevant, a possible combinatory therapy with compound **35** may enhance the antitumoral efficacy of 4-hydroxy-tamoxifen in ER-positive breast cancer cells. In silico ADME predictions indicated that these compounds exhibit good drug-likeness, which, together with their potential antitumoral effects and their lack of





## Article

# Design, Semisynthesis, and Estrogenic Activity of Lignan Derivatives from Natural Dibenzylbutyrolactones <sup>†</sup>

Priscila López-Rojas <sup>1,\*</sup>, Ángel Amesty <sup>1,\*</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez <sup>2</sup>, Yeray Brito-Casillas <sup>2</sup>, Borja Guerra <sup>2</sup>, Leandro Fernández-Pérez <sup>2,\*</sup> and Ana Estévez-Braun <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Bio-Orgánica, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 2, 38206 La Laguna, Tenerife, Spain; plopezro@ull.edu.es

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Paseo Blas Cabrera Felipe s/n, 35016 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; miguel.guerra106@alu.ulpgc.es (M.G.-R.); yeray.brito@ulpgc.es (Y.B.-C.); borja.guerra@ulpgc.es (B.G.)

\* Correspondence: aamesty@ull.edu.es (Á.A.); leandrofco.fernandez@ulpgc.es (L.F.-P.); aestebra@ull.edu.es (A.E.-B.)

<sup>†</sup> Dedicated to the memory of Professor Rafael Estévez-Reyes.

**Abstract:** Based on molecular docking studies on the ER $\alpha$ , a series of lignan derivatives (3–16) were designed and semisynthesized from the natural dibenzylbutyrolactones bursehernin (1) and matairesinol dimethyl ether (2). To examine their estrogenic and antiestrogenic potencies, the effects of these compounds on estrogen receptor element (ERE)-driven reporter gene expression and viability in human ER+ breast cancer cells were evaluated. Lignan compounds induced ERE-driven reporter gene expression with very low potency as compared with the pure agonist E2. However, coinubation of 5  $\mu$ M of lignan derivatives 1, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 13, and 14 with increasing concentrations of E2 (from 0.01 pM to 1 nM) reduced both the potency and efficacy of pure agonists. The binding to the rhER $\alpha$ -LBD was validated by TR-FRET competitive binding assay and lignans bound to the rhER $\alpha$  with IC<sub>50</sub> values from 0.16  $\mu$ M (compound 14) to 6  $\mu$ M (compound 4). Induced fit docking (IFD) and molecular dynamics (MD) simulations for compound 14 were carried out to further investigate the binding mode interactions. Finally, the in silico ADME predictions indicated that the most potent lignan derivatives exhibited good drug-likeness.

**Keywords:** natural products; lignans; estrogenic and antiestrogenic activities; induced fit docking (IFD); molecular dynamics (MD)



**Citation:** López-Rojas, P.; Amesty, Á.; Guerra-Rodríguez, M.; Brito-Casillas, Y.; Guerra, B.; Fernández-Pérez, L.; Estévez-Braun, A. Design, Semisynthesis, and Estrogenic Activity of Lignan Derivatives from Natural Dibenzylbutyrolactones. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 585. <https://doi.org/10.3390/ph15050585>

Academic Editors: Daniela Catarzi and Marialuigia Fantacuzzi

Received: 23 March 2022

Accepted: 4 May 2022

Published: 9 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



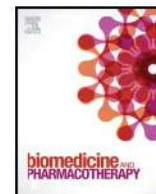
**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Lignans are a large group of natural products derived from the shikimic acid biosynthetic pathway. They are formed by a  $\beta$ - $\beta'$  (8-8') linkage between two phenylpropane units (C6-C3) with a different degree of oxidation in the side-chain and a different substitution pattern in the aromatic moieties [1]. On the basis of their structural patterns, including the way in which oxygen is incorporated into the skeletons, their carbon skeletons and the cyclization pattern lignans are classified into eight groups (arylnaphthalene, aryltetralin, dibenzocyclooctadiene, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactol, dibenzyl butyrolactone, furan, and furofuran) [1,2]. They exhibit a wide range of biological activities including antitumor activity [3–5], antiviral activity [6], antimetabolic activity [7,8], inhibition of the activity of enzymes such as cAMP phosphodiesterase [9] and cytochrome oxidase [10], anti-inflammatory activity [11], hypolipidemic activity [12], and estrogenic activity [13]. Regarding the estrogenic activity, lignans together with isoflavones, stilbenes, and coumestans constitute the major groups of phytoestrogens [14,15].

These compounds are considered to be natural selective estrogen receptor modulators (SERMs), since they induce estrogenic and/or antiestrogenic effects by weakly binding





## JKST6, a novel multikinase modulator of the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway that potentiates direct BCR-ABL1 inhibition and overcomes imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia

Haidée Aranda-Tavío<sup>a</sup>, Carlota Recio<sup>a</sup>, Pedro Martín-Acosta<sup>b</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez<sup>a</sup>, Yeray Brito-Casillas<sup>a</sup>, Rosa Blanco<sup>c</sup>, Vanessa Junco<sup>c</sup>, Javier León<sup>c</sup>, Juan Carlos Montero<sup>d</sup>, Lucía Gandullo-Sánchez<sup>d</sup>, Grant McNaughton-Smith<sup>f</sup>, Juan Manuel Zapata<sup>e</sup>, Atanasio Pandiella<sup>d</sup>, Angel Amesty<sup>b</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>b</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>a,\*</sup>, Borja Guerra<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario de Bio-Organica "Antonio González" (IUBO), Departamento de Química Orgánica, QUIBIONAT, Universidad de La Laguna (ULL), La Laguna, Spain

<sup>c</sup> Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC), Universidad de Cantabria-CSIC, Santander, Spain

<sup>d</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, CSIC and CIBERONC. Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

<sup>e</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" - CSIC, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>f</sup> Centro Atlántico del Medicamento (CEAMED) SA, La Laguna, Tenerife, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Chronic myelogenous leukemia  
BCR-ABL1  
Synergism  
Imatinib resistance

### ABSTRACT

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematological malignancy that highly depends on the BCR-ABL1/STAT5 signaling pathway for cell survival. First-line treatments for CML consist of tyrosine kinase inhibitors that efficiently target BCR-ABL1 activity. However, drug resistance and intolerance are still therapeutic limitations in Ph+ cells. Therefore, the development of new anti-CML drugs that exhibit alternative mechanisms to overcome these limitations is a desirable goal. In this work, the antitumoral activity of JKST6, a naphthoquinone-pyrone hybrid, was assessed in imatinib-sensitive and imatinib-resistant human CML cells. Live-cell imaging analysis revealed JKST6 potent antiproliferative activity in 2D and 3D CML cultures. JKST6 provoked cell increase in the subG1 phase along with a reduction in the G0/G1 phase and altered the expression of key proteins involved in the control of mitosis and DNA damage. Rapid increases in Annexin V staining and activation/cleavage of caspases 8, 9 and 3 were observed after JKST6 treatment in CML cells. Of interest, JKST6 inhibited BCR-ABL1/STAT5 signaling through oncokinasé downregulation that was preceded by rapid polyubiquitination. In addition, JKST6 caused a transient increase in JNK and AKT phosphorylation, whereas the phosphorylation of P38-MAPK and Src was reduced. Combinatory treatment unveiled synergistic effects between imatinib and JKST6. Notably, JKST6 maintained its antitumor efficacy in BCR-ABL1-T315I-positive cells and CML cells that overexpress BCR-ABL and even restored imatinib efficacy after a short exposure time. These findings, together with the observed low toxicity of JKST6, reveal a novel multikinase modulator that might overcome the limitations of BCR-ABL1 inhibitors in CML therapy.

### 1. Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disease associated with abnormal proliferation of clonal cells of the

myelogenous lineage [1]. This malignant myeloproliferative disorder is characterized by a chromosomal translocation t(9;22)(q34;q11) that provokes Philadelphia (Ph) chromosome emergence, a hallmark present in 95% of CML cases but also at lower frequencies in acute lymphoblastic

\* Corresponding authors at: Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

E-mail addresses: [leandroco.fernandez@ulpgc.es](mailto:leandroco.fernandez@ulpgc.es) (L. Fernández-Pérez), [borja.guerra@ulpgc.es](mailto:borja.guerra@ulpgc.es) (B. Guerra).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2021.112330>

Received 3 September 2021; Received in revised form 6 October 2021; Accepted 8 October 2021

Available online 19 October 2021

0753-3322/© 2021 The Author(s).

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).







## Article

# Modular Synthesis and Antiproliferative Activity of New Dihydro-1*H*-pyrazolo[1,3-*b*]pyridine Embelin Derivatives

Pedro Martín-Acosta <sup>1</sup>, Ángel Amesty <sup>1</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez <sup>2</sup> , Borja Guerra <sup>2</sup> ,  
Leandro Fernández-Pérez <sup>2,\*</sup> and Ana Estévez-Braun <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Orgánica, Instituto Universitario de Bio-Organica Antonio González, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Francisco Sánchez No. 2, 38206 Tenerife, Spain; pmartina@ull.edu.es (P.M.-A.); aarnesty@ull.edu.es (Á.A.)

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Farmacología Molecular y Traslacional (BIOPharm), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), 35001 Las Palmas de Gran Canaria, Spain; miguel.guerra106@alu.ulpgc.es (M.G.-R.); borja.guerra@ulpgc.es (B.G.)

\* Correspondence: leandrofco.fernandez@ulpgc.es (L.F.-P.); aestebra@ull.edu.es (A.E.-B.)

**Abstract:** A set of new dihydro-1*H*-pyrazolo[1,3-*b*]pyridine and pyrazolo[1,3-*b*]pyridine embelin derivatives was synthesized through a multicomponent reaction from natural embelin, 3-substituted-5-aminopyrazoles and aldehydes. The synthesized compounds were evaluated against three hematologic tumor cell lines, HEL (acute erythroid leukemia), K-562 (chronic myeloid leukemia) and HL-60 (acute myeloid leukemia), and five breast cancer cell lines (SKBR3, MCF-7, MDA-MB-231, BT-549, HS-578T). The primate non-malignant kidney Vero cell line was used as the control of cytotoxicity. From the obtained results, some structure–activity relationships were outlined. Furthermore, in silico prediction of physicochemical properties and ADME parameters were determined for the derivatives with the best antiproliferative values.

**Keywords:** multicomponent reaction; embelin; antiproliferative activity; SAR



**Citation:** Martín-Acosta, P.; Amesty, Á.; Guerra-Rodríguez, M.; Guerra, B.; Fernández-Pérez, L.; Estévez-Braun, A. Modular Synthesis and Antiproliferative Activity of New Dihydro-1*H*-pyrazolo[1,3-*b*]pyridine Embelin Derivatives. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1026. <https://doi.org/10.3390/ph14101026>

Academic Editor: Valentina Onnis

Received: 7 September 2021

Accepted: 4 October 2021

Published: 8 October 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Heterocyclic compounds are of great importance in medicinal chemistry [1]. Molecules with these structures are present in many essential compounds for life as nucleic acids, amino acids, chlorophyll or vitamins, among others [2]. Titarenko et al. demonstrated during the development of the BioCore strategy [3] that more than 67% of the molecules included in the “Comprehensive Medicinal Chemistry” database contain heterocyclic rings. The non-aromatic heterocycles are twice as abundant as the heteroaromatics [4] and the combination of both is frequently present in alkaloids and drugs [5]. Among all heterocycles, nitrogenated heterocycles are particularly relevant in medicinal chemistry. Furthermore, an analysis of the approved drugs by the FDA database conducted by Njardarson et al. [6], revealed that 59% of them contained nitrogenated heterocycles. Pyrazoles are very attractive nitrogenated scaffolds since molecules having pyrazoles fused to other heterocycles such as dihydro-1*H*-pyrazolo[1,3-*b*]pyridines and pyrazolo[3,4-*b*]pyridines have raised great interest due to the biological activities that they exhibit. Figure 1 shows some examples of antitumoral compounds that exhibit this type of structure such as spirooxindoles (A) with cytotoxic activity against triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cell line [7], compound (B) with potent and selective inhibitory activity against FGFR kinase [8] and compound (C) as potent tubulin polymerization inhibition [9].

Several synthetic methodologies for the preparation of dihydro-1*H*-pyrazolo[1,3-*b*]pyridines and pyrazolo[3,4-*b*]pyridines are found in the literature. Of special interest are those based on multicomponent reactions (MCRs), such as those involving the condensation of 1,3-dicarbonyl compounds with aldehydes and aminopyrazole derivatives [10].





# The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy

**Borja Guerra\***, **Carlota Recio**, **Haidée Aranda-Tavío**, **Miguel Guerra-Rodríguez**, **José M. García-Castellano** and **Leandro Fernández-Pérez\***

*Molecular and Translational Pharmacology Lab, Institute for Biomedical and Health Research (IUIBS), University of Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain*

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Miriam Martini,  
University of Turin, Italy

### Reviewed by:

Khalid Omer Alfarouk,  
Alfarouk Biomedical Research LLC,  
United States  
Parames C. Sil,  
Bose Institute, India

### \*Correspondence:

Borja Guerra  
borja.guerra@ulpgc.es  
Leandro Fernández-Pérez  
leandrofco.fernandez@ulpgc.es

### Specialty section:

This article was submitted to  
Cancer Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

**Received:** 07 November 2020

**Accepted:** 18 January 2021

**Published:** 25 February 2021

### Citation:

Guerra B, Recio C, Aranda-Tavío H, Guerra-Rodríguez M, García-Castellano JM and Fernández-Pérez L (2021) The Mevalonate Pathway, a Metabolic Target in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 11:626971. doi: 10.3389/fonc.2021.626971

A hallmark of cancer cells includes a metabolic reprogramming that provides energy, the essential building blocks, and signaling required to maintain survival, rapid growth, metastasis, and drug resistance of many cancers. The influence of tumor microenvironment on cancer cells also results an essential driving force for cancer progression and drug resistance. Lipid-related enzymes, lipid-derived metabolites and/or signaling pathways linked to critical regulators of lipid metabolism can influence gene expression and chromatin remodeling, cellular differentiation, stress response pathways, or tumor microenvironment, and, collectively, drive tumor development. Reprogramming of lipid metabolism includes a deregulated activity of mevalonate (MVA)/cholesterol biosynthetic pathway in specific cancer cells which, in comparison with normal cell counterparts, are dependent of the continuous availability of MVA/cholesterol-derived metabolites (i.e., sterols and non-sterol intermediates) for tumor development. Accordingly, there are increasing amount of data, from preclinical and epidemiological studies, that support an inverse association between the use of statins, potent inhibitors of MVA biosynthetic pathway, and mortality rate in specific cancers (e.g., colon, prostate, liver, breast, hematological malignances). In contrast, despite the tolerance and therapeutic efficacy shown by statins in cardiovascular disease, cancer treatment demands the use of relatively high doses of single statins for a prolonged period, thereby limiting this therapeutic strategy due to adverse effects. Clinically relevant, synergistic effects of tolerable doses of statins with conventional chemotherapy might enhance efficacy with lower doses of each drug and, probably, reduce adverse effects and resistance. In spite of that, clinical trials to identify combinatory therapies that improve therapeutic window are still a challenge. In the present review, we revisit molecular evidences showing that deregulated activity of MVA biosynthetic pathway has an essential role in oncogenesis and drug resistance, and the potential use of MVA pathway inhibitors to improve therapeutic window in cancer.

**Keywords:** mevalonate, cholesterol, oxysterols, isoprenoids, sterol regulatory element binding protein, cancer, statins





## RESEARCH PAPER

# IL-17-induced inflammation modulates the mPGES-1/PPAR- $\gamma$ pathway in monocytes/macrophages

Federica Raucci<sup>1</sup> | Anella Saviano<sup>1</sup> | Gian Marco Casillo<sup>1</sup> | Miguel Guerra-Rodriguez<sup>2</sup> | Adel Abo Mansour<sup>2,3</sup> | Marialuisa Piccolo<sup>1</sup> | Maria Grazia Ferraro<sup>1</sup> | Elisabetta Panza<sup>1</sup> | Valentina Vellecco<sup>1</sup> | Carlo Irace<sup>1</sup> | Francesco Caso<sup>4</sup> | Raffaele Scarpa<sup>4</sup> | Nicola Mascolo<sup>1</sup> | Mohammed Alfaifi<sup>3</sup> | Asif Jilani Iqbal<sup>1,2</sup>  | Francesco Maione<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, School of Medicine and Surgery, University of Naples Federico II, Naples, Italy

<sup>2</sup>Institute of Cardiovascular Sciences (ICVS), College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, UK

<sup>3</sup>Department of Clinical Laboratory Sciences, College of Applied Medical Sciences, King Khalid University, Abha, Saudi Arabia

<sup>4</sup>Rheumatology Unit, Department of Clinical Medicine and Surgery, School of Medicine and Surgery, University of Naples Federico II, Naples, Italy

## Correspondence

Asif Jilani Iqbal, Institute of Cardiovascular Sciences (ICVS), College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, B15 2TT, UK.  
Email: a.j.iqbal@bham.ac.uk

Francesco Maione, ImmunoPharmaLab, Department of Pharmacy, School of Medicine, University of Naples Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131, Naples, Italy.  
Email: francesco.maione@unina.it

## Funding information

MIUR, Grant/Award Number: 2017A95NCJ/2017A95NCJ\_002

**Background and Purpose:** Recent biochemical and pharmacological studies have reported that in several tissues and cell types, microsomal PGE<sub>2</sub> synthase (mPGES) and PPAR- $\gamma$  expression are modulated by a variety of inflammatory factors and stimuli. Considering that very little is known about the biological effects promoted by IL-17 in the context of mPGES-1/PPAR- $\gamma$  modulation, we sought to investigate the contribution of this unique cytokine on this integrated pathway during the onset of inflammation.

**Experimental Approach:** We evaluated effects of PF 9184 (mPGES-1 inhibitor) and troglitazone (PPAR- $\gamma$  agonist) in vitro, using the mouse macrophage cell line J774A.1. In vivo, the dorsal air pouch model in CD1 mice was used, and inflammatory infiltrates were analysed by flow cytometry. Locally produced cyto-chemokines and PGs were assessed using ELISA assays. Western blots were also employed to determine the activity of various enzymes involved in downstream signalling pathways.

**Key Results:** PF 9184 and troglitazone, in a time- and dose-dependent manner, modulated leukocyte infiltration, myeloperoxidase activity, and the expression of COX-2/mPGES-1, NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$ , and mPTGDS-1/PPAR- $\gamma$ , induced by IL-17. Moreover, both PF 9184 and troglitazone modulated PG (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, and PGJ<sub>2</sub>) production, the expression of different pro-inflammatory cyto-chemokines, and the recruitment of inflammatory monocytes, in response to IL-17.

**Conclusions and Implications:** Our data suggest that IL-17 may constitute a specific modulator of inflammatory monocytes during later phases of the inflammatory response. The results of this study show, for the first time, that the IL-17/mPGES-1/PPAR- $\gamma$  pathway could represent a potential therapeutic target for inflammatory-based and immune-mediated diseases.


**Abbreviations:** 15d-PGJ<sub>2</sub>, 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-PGJ<sub>2</sub>; C5a, complement component 5a; CD, Crohn's disease; CMC, carboxymethyl cellulose; cPGES-, cytosolic PGE<sub>2</sub> synthase; FCS, fetal calf serum; IMIDs, immune-mediated inflammatory diseases; I $\kappa$ B- $\alpha$ , nuclear factor  $\kappa$ -B inhibitor  $\alpha$ ; JE, junctional epithelium; KC, keratinocyte chemoattractant; MCSF, macrophage colony-stimulating factor; MIPs, macrophage inflammatory proteins; mPGES-, microsomal PGE<sub>2</sub> synthase-; MPO, myeloperoxidase; NKT, natural killer T; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; OA, osteoarthritis; PBS-T, PBS Tween; PMN, polymorphonuclear leukocytes; PsA, psoriatic arthritis; PUFA, polyunsaturated fatty acid; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondylarthritis; Th, T-helper; TIMP-1, metalloproteinase inhibitor-1; TREM-1, triggering receptor expressed on myeloid cells-1.

Asif Jilani Iqbal and Francesco Maione share senior authorship.





# Signal transducer and activator of transcription (STAT)-5: an opportunity for drug development in oncohematology

Carlota Recio <sup>1</sup> · Borja Guerra<sup>1</sup> · Miguel Guerra-Rodríguez<sup>1</sup> · Haidée Aranda-Tavío<sup>1</sup> · Patricia Martín-Rodríguez<sup>1</sup> · Mercedes de Mirecki-Garrido<sup>1</sup> · Yeray Brito-Casillas<sup>1</sup> · José M. García-Castellano<sup>1</sup> · Ana Estévez-Braun<sup>2</sup> · Leandro Fernández-Pérez<sup>1</sup>

Received: 9 November 2018 / Revised: 9 January 2019 / Accepted: 3 February 2019  
© Springer Nature Limited 2019

## Abstract

The signal transducer and activator of transcription (STAT) are transcription factors that work via JAK/STAT pathway regulating the expression of genes involved in cell survival, proliferation, differentiation, development, immune response, and, among other essential biological functions, hematopoiesis. JAK/STAT signaling is strictly regulated under normal physiological conditions. However, a large group of diverse diseases has been associated to an aberrant regulation of STAT factors. Erroneous modulation of the pathway leads to constitutive STAT activation, thereby driving proliferation, inflammation, and an uncontrolled immune response. Deregulated STAT5 activation has been found in the development of many hematopoietic tumors, including chronic and acute leukemias, polycythemia vera, and lymphoma. Mutations in the kinases that phosphorylate STAT5, and/or overexpression of the upstream receptor-associated tyrosine kinases have been suggested as the main drivers of constitutive STAT5 activation. Hyper-activated STAT5 leads to the aberrant expression of its target genes including antiapoptotic, proliferative, and pro-inflammatory genes, favouring tumorigenesis. In this review, we intend to discuss the biology of JAK/STAT pathway, with particular focus on STAT5 and its crucial role in the development and progression of hematologic malignancies. Furthermore, we provide a synopsis of potential therapeutic strategies based on STAT5 activity inhibition that may represent an excellent opportunity for drug development in oncohematology.

## Introduction

The Janus kinase (JAK) signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway is an intracellular mechanism which connects the extracellular signaling from cytokines, growth factors, and hormones, with the transcriptional machinery in the nucleus [1]. It is an evolutionarily highly conserved cellular cascade that includes the tyrosine kinase JAK, the transcription factor STAT, and different regulatory

proteins. In mammals, four JAKs and seven STATs have been identified [2]. Numerous essential cellular responses are mediated by JAK/STAT signaling, including cell proliferation, differentiation and migration, apoptosis, and cell survival. These cellular events are critical to a variety of biological functions like mammary gland development and lactation, sexually dimorphic growth, adipogenesis, angiogenesis, immune development, inflammatory response, and hematopoiesis [2, 3]. Under physiological conditions, JAK/STAT pathway activation–deactivation is tightly regulated. However, aberrant regulation of JAK/STAT has been identified in different pathological conditions such as cancer, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis [3]. Dysregulation is commonly associated to permanent STAT activation, which has been reported to promote tumorigenesis, high-grade inflammation, and hyper-growing, among other processes, depending on the STAT family member [4]. Notably, among STAT proteins, STAT5 has emerged as a key activated transcription factor in many cancers [5]. Chiefly in hematologic cancers (HCs), STAT5

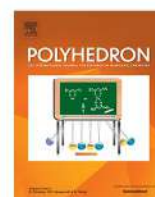
✉ Carlota Recio  
carlota.recio@ulpgc.es

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Farmacología Molecular y Traslacional - BIOPham, Las Palmas de G.C., 35016 Las Palmas, Spain

<sup>2</sup> Instituto Universitario de Bio-Organica (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, 38206 Tenerife, Spain







## Synthesis, characterization and antiproliferative activity of mixed ligand complexes of Cu<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> with lapachol

Rita Hernández-Molina<sup>a,b</sup>, Pavel A. Abramov<sup>a,b,c,\*</sup>, Javier González-Platas<sup>d,e</sup>, Sandra Oramas-Royo<sup>b,f</sup>, Ana Estévez-Braun<sup>b,f</sup>, Miguel Guerra-Rodríguez<sup>g</sup>, Haidée Aranda-Tavío<sup>g</sup>, Borja Guerra<sup>g</sup>, Leandro Fernández-Pérez<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Unidad Departamental de Química Inorgánica, Universidad de La Laguna 38200, La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>b</sup> Instituto Universitario de Biología Antonio González, Avda Astrofísico Francisco Sánchez Nº 2, E-38206 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>c</sup> Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, 630090 Novosibirsk, Russia

<sup>d</sup> Departamento de Física, Universidad de La Laguna, Avd. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, E-38200 La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>e</sup> Instituto Universitario de Estudios Avanzados en Física Atómica, Molecular y Fotónica (IUDEA) and MALTA Consolider Team, Universidad de La Laguna, Avda. Astrofísico Fco. Sánchez s/n, La Laguna, Tenerife E-38204, Spain

<sup>f</sup> Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna, Tenerife, Spain

<sup>g</sup> Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Laboratorio de Farmacología Molecular y Traslacional, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 25 November 2018

Accepted 8 March 2019

Available online 21 March 2019

#### Keywords:

Lapachol

Copper

Cobalt

X-ray structures

Biological activity

### ABSTRACT

Mixed ligand complexes [Cu(phen)(Lap)<sub>2</sub>] (**1**) and [Co(dppeO)(Lap)<sub>2</sub>] (**2**) were synthesized from the reaction of lapachol (Lap) with [Cu(phen)Cl<sub>2</sub>] or [Co(dppe)Cl<sub>2</sub>] in the presence of Et<sub>3</sub>N. Complexes (**1**) and (**2**) were fully characterized by X-ray crystallography, elemental analyses, and infrared spectroscopy. Antiproliferative activities of complexes (**1**) and (**2**) against several tumor cell lines were also determined alongside those of [Cu(Lap)<sub>2</sub>(EtOH)<sub>2</sub>] (**3**) and [Co(Lap)<sub>2</sub>(EtOH)<sub>2</sub>] (**4**).

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lapachol, 2-hydroxy-3-(3'-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lap, Fig. 1), is a natural product obtained from the bark of various trees of the Bignoniaceae family. Several reports about the antitumor [1], antibiotic [2], antimalarial [3,4], trypanocidal [5] and leishmanicidal [6,7] activities of lapachol have been reported. Lapachol derivatives with pharmacological activities have also been studied [8,9], which shows the potential of lapachol functionalization to find new bioactive compounds. In general, the activity of the lapachol derivatives is related to the generation of reactive oxygen species (ROS) by redox cycling or intercalation between DNA base pairs [10]. Hence, the study of redox properties of these species is fundamental to understand the mechanism of bioactivity [11]. Electrochemical studies of the reduction of lapachol in DMF/TBAP 0.1 mol l<sup>-1</sup> on Hg and glassy carbon electrode

have been published, and the potential of the first well-defined wave, at  $\nu = 0.100 \text{ V s}^{-1}$  was determined as  $-0.715$  [12]. The introduction of electron-withdrawing or electron-donating groups can modulate the properties of this type of compound and represents an important strategy to obtain new active compounds [13]. A way to modulate the activity of naphthoquinones, such as lapachol, is the formation of metal complexes. Several metal complexes with lapachol as ligand are known [14–18]. In particular [Cu(Lap)<sub>2</sub>(bpy)] which is similar to presented complexes has been reported [17]. A manganese(II) lapacholate polymer has been described [19], where lapachol acts as a tridentate ligand, with two adjacent oxygen atoms chelating the metal and the remaining *trans*-quinonic oxygen binds to adjacent metal center. Correlation between the ROS and the cytotoxicity has been studied [19]. A series of naphthoquinones alongside a series of metal complexes derived from hydroxynaphthoquinones, such as lawsone, bis-lawsone, lapachol, plumbagin and juglone have been prepared [20]. Crystal structure, spectroscopic and thermal properties of [Zn(Lap)<sub>2</sub>(DMF)(H<sub>2</sub>O)] and isomorphous [M(Lap)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> (M: Cd, Mn) complexes have been

\* Corresponding authors at: Departamento de Química, Unidad Departamental de Química Inorgánica, Universidad de La Laguna 38200, La Laguna, Tenerife, Spain.

E-mail address: [abramov@niic.nsc.ru](mailto:abramov@niic.nsc.ru) (P.A. Abramov).





# Effective resolution of the Y chromosome sublineages of the Iberian haplogroup R1b-DF27 with forensic purposes

Patricia Villaescusa<sup>1</sup> · Leire Palencia-Madrid<sup>1</sup> · Magdalena Antònia Campaner<sup>1</sup> · Jaione Jauregui-Rada<sup>1</sup> · Miguel Guerra-Rodríguez<sup>1</sup> · Ana María Rocandio<sup>1</sup> · Marian M. de Pancorbo<sup>1</sup>

Received: 6 July 2018 / Accepted: 7 September 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) found within the non-recombining region of the Y chromosome (NRY) represent a powerful tool in forensic genetics for inferring the paternal ancestry of a vestige and complement the determination of biogeographical origin in combination with other markers like AIMs. In the present study, we introduce a panel of 15 Y-SNPs for a fine-resolution subtyping of the haplogroup R1b-DF27, in a single minisequencing reaction. This is the first minisequencing panel that allows a fine subtyping of R1b-DF27, which displays high frequencies in Iberian and Iberian-influenced populations. This panel includes subhaplogroups of DF27 that display moderate geographical differentiation, of interest to link a sample with a specific location of the Iberian Peninsula or with Iberian ancestry. Conversely, part of the intricacy of a new minisequencing panel is to have all the included variants available to test the effectiveness of the analysis method. We have overcome the absence of the least common variants through site-directed mutagenesis. Overall, the results show that our panel is a robust and effective method for subtyping R1b-DF27 lineages from a minimal amount of DNA, and its high resolution enables to improve male lineage discrimination in Iberian and Southwest European descent individuals. The small length of the amplicons and its reproducibility makes this assay suitable for forensic and population genetics purposes.

**Keywords** Y chromosome · Y-SNPs · SNaPshot · Site-directed mutagenesis · R1b-DF27

## Introduction

The usefulness of Y chromosome polymorphisms is well established in many different scientific areas. The non-recombining region of the Y chromosome (NRY) allows to reconstruct patrilineal lineages as it is transmitted unchanged from fathers to their sons, except for occasional mutations that accumulate over time and remain reflected in the evolutionary record [1]. Y chromosome SNPs (Y-

SNPs) display low mutation rates and possess a hierarchical structure [2], which makes them informative for evolutionary as well as for forensic studies. Since their geographical distribution is nonrandom [3], they can be employed for inferring the paternal biogeographic ancestry of an unknown contributor to a crime scene [4], an analysis of particular interest in cases where other markers (like Y-STRs) have failed or when the DNA is degraded.

In West Europe, the most common haplogroup is R1b-M269, with frequencies ranging from 40 to 80% [5]. The most important sub-branches of R1b-M269 are U106, more frequent in NC Europe [5, 6], and P312, which is more common in SW Europe [5]. P312, likewise, is divided in the following sublineages: U152, in North Italy and Switzerland [6]; M529 in the British Isles [7]; L238, in Scandinavia [8]; DF27, in the Iberian Peninsula [8, 9]; and DF19, of unknown distribution. DF27, firstly discovered by citizen scientists [8], remained relatively unnoticed in the academic bibliography until not long ago. However, during the last years, the scientific community has grown largely interested in this paternal lineage [10, 11], revealing its near-specificity in the Iberian Peninsula

Patricia Villaescusa and Leire Palencia-Madrid contributed equally to this work.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00414-018-1936-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Marian M. de Pancorbo  
marian.mdepancorbo@ehu.es

<sup>1</sup> BIOMICs Research Group, Lascaray Research Center, University of the Basque Country UPV/EHU, Avda. Miguel de Unamuno, 3, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain





02 

# The Janus Kinase in Hematological

  
03 

# Cancer

04 *Carlota Recio, Haidée Aranda-Tavío,*05 *Miguel Guerra-Rodríguez,*06 *Mercedes de Mirecki-Garrido, Patricia Martín-Rodríguez,*07 *Borja Guerra and Leandro Fernández-Pérez*08 **Abstract**

09 Janus kinases (JAKs) play an essential role in the regulation of cytokine signal-  
10 ing. They control cell survival, proliferation, differentiation, immune response, and  
11 hematopoiesis. Deregulation of JAK signaling has been associated to the pathogen-  
12 esis of numerous immune-inflammatory diseases, hematological malignancies, and  
13 solid tumors. Thus, JAK proteins have emerged as attractive therapeutic targets in  
14 the last decade. The discovery of the gain-of-function JAK2 mutation (JAK2 V617F)  
15 as the main cause of polycythemia vera—a chronic myeloproliferative syndrome—  
16 led to the development of the JAK inhibitor ruxolitinib. This key finding opened  
17 the door to the search for new therapeutic agents able to suppress the constitutive  
18 activation of JAK signaling in hematological cancers and other tumors. However,  
19 given the conserved nature of the kinase domain among JAK family members, and  
20 the interrelated roles of JAK kinases in many physiological processes, including  
21 hematopoiesis and immunity, the broad usage of JAK inhibitors in hematology is  
22 challenged by their narrow therapeutic window. Novel therapies are, therefore,  
23 needed. This chapter focuses on the understanding of the complex signaling of  
24 JAK proteins in cancerous cells, the various JAK aberrations implicated in myelo-  
25 proliferative neoplasms, leukemia, and lymphoma, and the clinically available JAK  
26 inhibitors in cancer therapy.

27 **Keywords:** blood cancer, hematological tumor, JAK, STAT, mutation, JAK2 V617F28 **1. Introduction**

29 The Janus kinase (JAK) signal transducer and activators of transcription (STAT)  
30 intracellular pathway connect the signaling from extracellular cytokines, hormones,  
31 and growth factors, with the nuclear transcriptional machinery [1]. It is expressed  
32 in animals from flies to humans, being highly evolutionarily conserved [2]. The  
33 cascade consists of the tyrosine kinase JAK, the transcription factor STAT, and  
34 different regulatory proteins. In mammals, four JAKs and seven STATs have been  
35 identified [3]. JAK/STAT signaling controls numerous essential cellular responses,  
36 including cell proliferation, differentiation, migration, immune response, apopto-  
37 sis, and cell survival, according to the signal, cell context, and tissue [4, 5]. These  
38 cellular events are crucial to a wide range of biological functions like hematopoiesis,













**ULPGC**  
**Universidad de**  
**Las Palmas de**  
**Gran Canaria**

---