



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Facultad de Química

INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE
MAMA MURINO POR COMPUESTOS DERIVADOS DE BORO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Marcos Uriel González Pérez

Asesor de Tesis:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Asesor externo:

Dra. Nayelli Nájera García

Toluca, México

2023

ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	- 5 -
AGRADECIMIENTOS	- 6 -
RESUMEN.....	13
ABSTRACT	15
1. ANTECEDENTES.....	15
1.1 Historia del cáncer de mama	17
1.2 Uso de compuestos borados contra el cáncer de mama	20
1.3 Cáncer de mama como problema de salud pública	22
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1 Fisiopatología del cáncer de mama	23
2.2 Tipos de tumores en cáncer de mama.....	27
2.3 Terapias contra el cáncer de mama.....	31
2.4 Compuestos probados	34
2.5 Doxorrubicina.....	36
2.6 Cultivo celular	38
2.7 Interacciones entre fármacos.....	39
3. JUSTIFICACIÓN	40
4. HIPÓTESIS.....	41
5. OBJETIVOS.....	42

5.1 General	42
5.2 Particulares	42
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
6.1 Cultivo de las líneas celulares utilizadas.....	43
6.2 Estimulación de las células con los compuestos borados.....	45
6.3 Ensayos de viabilidad celular	47
6.4 Gráficas y análisis estadístico	50
7. RESULTADOS.....	51
7.1 Curvas de concentraciones y cálculos de las CI_{50}	51
7.2 Comparación de las CI_{50}	60
7.3 Análisis del efecto combinado de fármacos	62
8. DISCUSIÓN	65
9. CONCLUSIONES.	69
10. REFERENCIAS.	70
11. ANEXOS.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los subtipos de cáncer de mama. Tomado de [19]. RE: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona.....	29
Tabla 2. Subtipos de CMTN y sus principales características. Tomado de [23]. RE: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona. RA: Receptor Andrógeno.....	30
Tabla 3. Características químicas de los compuestos empleados.	36
Tabla 4. Compuestos y sus concentraciones utilizadas en la estimulación de las líneas células 4T1 y C2C12.	46
Tabla 5. Representación de la estimulación en la caja de 96 pozos con los compuestos borados para la curva de concentración.....	46
Tabla 7. Representación de la estimulación en la caja de 96 pozos para las curvas de sinergismo.	47
Tabla 8. Concentraciones inhibitorias de los compuestos probados en células tumorales	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de células mamarias normales (izquierda) y las células mamarias tumorales (derecha). Tomado de [18].	27
Figura 2. Posibles tratamientos al cáncer de mama. Tomado de [26].	32
Figura 3. Estructura química, nombre IUPAC (nombre clave de identificación) de los compuestos utilizados.	34
Figura 4. Estructura química de doxorubicina (DOXO).	36
Figura 5. Cultivo celular. Tomado de [34].	38
Figura 6. Células 4T1 en cultivo con una confluencia del 80%.	43
Figura 7. Células C2C12 en cultivo con una confluencia de 80%.	44
Figura 8. Conversión enzimática en la mitocondria de la célula. Modificado de [44].	48
Figura 9. Técnica de viabilidad MTT en células 4T1.	49
10. Técnica de viabilidad CV en células 4T1.	50
Figura 11. Efecto citotóxico del fármaco DOXO en células 4T1 y C2C12. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.	51
Figura 12. % de número de células de 4T1 y C2C12, las CI_{50} de DOXO fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %.	52
Figura 13. Efecto citotóxico del compuesto A1 en células 4T1 y C2C12. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.	53
Figura 14. % de número de células de 4T1 y C2C12 del compuesto A1.	54

Figura 15. Efecto citotóxico del compuesto A37 en células 4T1 y C2C12. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$ 55

Figura 16. % de número de células de 4T1 y C2C12, las CI_{50} de A37 fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %. 56

Figura 17. Efecto citotóxico del compuesto A46 en células 4T1 y C2C12. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$ 57

Figura 18. % de número de células de 4T1 y C2C12, las CI_{50} de A46 fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %. 58

Figura 19. Efecto citotóxico del compuesto A57 en células 4T1 y C2C12. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$ 59

Figura 20. % de número de células de 4T1 y C2C12, las CI_{50} de A57 no se pudieron obtener mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %. 60

Figura 21. Comparación de las CI_{50} obtenidos en ambas líneas celulares. 61

Figura 22. Efecto citotóxico de los compuesto A37, A46, DOX y sus combinaciones en células 4T1. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$ 63

Figura 23. Efecto citotóxico de los compuesto A37, A46, DOX y sus combinaciones en células 4T1. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL. Los

resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un *P<0,05..... 65

RESUMEN

Antecedentes: El cáncer de mama es el tipo más común en el mundo y es la quinta causa de muerte por cáncer, cada año se registran 685 mil defunciones por esta patología en el mundo y cerca de 8 mil en México, lo que lo ha convertido es un problema de salud pública mundial y en México. Debido a esto, es necesario encontrar nuevas terapias farmacológicas para tratar esta enfermedad. Se han realizado diversos estudios que mostraron efectos anticancerígenos de compuestos derivados de boro (B), los efectos dependen del tipo de cáncer. Algunos de éstos son: disminuir el riesgo de padecer la enfermedad al regular las hormonas esteroides, disminuir el proceso de proliferación de las células tumorales, aumentar los metabolitos anticancerígenos, inhibir la expresión de ciclinas lo que conlleva a prevenir la metástasis, además de presentar efectos antioxidantes y antiinflamatorios al aumentar la expresión de estrógenos, entre otros.

Objetivo: Evaluar la actividad anti proliferativa de cuatro compuestos borados, ácido bórico (A1), ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37), ácido fenantren-9-il borónico (A46) y ácido 9H-fluoren-2-il borónico (A57) en una línea celular murina de cáncer de mama triple negativo (4T1)

Método: Se cultivaron células 4T1 y células de mioblasto de ratón (C2C12) las cuales se estimularon con los compuestos borados a diferentes concentraciones por 5 días, posteriormente se evaluó la viabilidad de las células con la técnica de MTT y cristal violeta. Se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y se determinó su potencia en las células 4T1, también se observó la selectividad, la cual se midió comparando las CI₅₀ de cada compuesto en ambas líneas celulares. Finalmente, se determinó la existencia de sinergismo de los compuestos derivados de B con doxorubicina (DOXO) mediante ensayos de interacción farmacológica.

Resultados y discusión: Los compuestos A37 y A46 presentaron efecto inhibitorio de la proliferación de las células tumorales sin presentar el mismo efecto en las células no

tumorales. Las CI_{50} de A37 son 0.1969 μM y 0.645 μM para las células 4T1 y C2C12 respectivamente, para A46 solo se pudo obtener la CI_{50} en las células 4T1 que fue de 0.2251 μM , ya que en las células C2C12 no se mostró un efecto concentración dependiente adecuado. Los A1 y A57 no presentaron un efecto anti proliferativo concentración dependiente adecuado ni significativo, por lo cual, no se obtuvieron las CI_{50} de ningún de los dos compuestos en ambas líneas celulares. Tampoco se observó un sinergismo de los compuestos borados con DOXO.

Conclusión: Las CI_{50} de los compuestos que presentaron inhibición de las células tumorales son 8-10 veces mayores a las de DOXO, sin embargo, estos compuestos demostraron no tener el mismo efecto en células no tumorales como el que presentó DOXO, así mismo no se presentó un sinergismo de los compuestos borados probados y DOXO.

ABSTRACT

Background: Breast cancer is the most common type in the world and is the fifth leading cause of death from cancer, each year there are 685 thousand deaths from this pathology in the world and about 8 thousand in Mexico, which has made it a global public health problem and in Mexico. Because of this, it is necessary to find new drug therapies to treat this disease. There have been several studies that showed anticancer effects of boron (B) derived compounds, the effects depend on the type of cancer. Some of these are: reduce the risk of suffering from the disease by regulating steroid hormones, decrease the proliferation process of tumor cells, increase anticancer metabolites, inhibit the expression of cyclins which leads to prevent metastasis, in addition to presenting antioxidant and anti-inflammatory effects by increasing the expression of estrogen, among others.

Objective: To evaluate the antiproliferative activity of four boronic compounds, boric acid (A1), boronic (6-hydroxynymphalen-2-yl) acid (A37), phenantren-9-yl boronic acid (A46) and 9H-fluoren-2-yl boronic acid (A57) in a murine cell line of triple-negative breast cancer (4T1)

Method: 4T1 cells and mouse myoblast cells (C2C12) were cultured and stimulated with borados compounds at different concentrations for 5 days, then the viability of the cells was evaluated with the MTT and violet crystal technique. The inhibitory concentration 50 (IC50) was calculated and its potency in the 4T1 cells was determined, selectivity was also observed, which was measured by comparing the IC50 of each compound in both cell lines. Finally, the existence of synergism of compounds derived from B with doxorubicin (DOXO) was determined by drug interaction assays.

Results and discussion: Compounds A37 and A46 showed inhibitory effect on tumor cell proliferation without presenting the same effect on non-tumor cells. The IC50 of A37 are 0.1969 μM and 0.645 μM for 4T1 and C2C12 cells respectively, for A46 only the IC50 could be obtained in 4T1 cells which was 0.2251 μM , since in C2C12 cells an adequate concentration-dependent effect was not shown. The A1 and A57 did not present an adequate or significant concentration-dependent antiproliferative effect,

therefore, the IC₅₀ of either of the two compounds in both cell lines were not obtained. Nor was a synergism of the compounds borados with DOXO.

Conclusion: The IC₅₀ of the compounds that presented inhibition of tumor cells are 8-10 times greater than those of DOXO, however, these compounds showed not to have the same effect on non-tumor cells as the one presented by DOXO, likewise a synergism of the compounds borados tested and DOXO.

1. ANTECEDENTES

1.1 HISTORIA DEL CÁNCER DE MAMA

En la antigua civilización egipcia, alrededor de los años 3000-2500 a.C da inicio la historia del cáncer de mama, en el papiro llamado *Edwin Smith Surgical Papyrus* se da la primera documentación de un caso y el procedimiento contra tumores en la mama [1]. Después de más de 2000 años, Hipócrates (460-370 a.C) desarrolla su teoría de los cuatro humores y creía que el aumento de uno de ellos, la bilis negra, era la causa de los tumores mamarios y si no se trataban, éstos podían reventar y liberar la bilis al resto del cuerpo. Con el paso del tiempo surgirían más teorías y nuevos conocimientos sobre el cáncer de mama, como en el año 200 d.C cuando Claudius Galenus definió a los tumores mamarios como crecimientos anormales de la mama y se percató que eran más comunes en mujeres con ciclo menstrual anormal o nulo que en mujeres con ciclo menstrual regular y hombres. En el siglo I, los tumores se trataban extrayendo el músculo pectoral en su totalidad, sin embargo, Galenus propuso un tipo de lumpectomía donde sólo se retiraba la parte del tumor y al no ser tomado en cuenta se siguieron realizando la remoción del pectoral durante toda la edad media [2].

En el siglo XVI, Descartes propuso la teoría de la linfa y más tarde Stahl y Hoffman teorizaron que el cáncer se componía de linfa fermentada y degenerada por su acidez o alcalinidad [3]. Mientras tanto en el año de 1717, Bernardino Ramazzini publicó la segunda edición de su libro *De morbis artificum diatriba*, en el cual, describió una alta frecuencia de cáncer de mama en monjas italianas al compararlas con mujeres casadas, concluyó que la causa era el celibato pues éste causaba la inestabilidad de los órganos reproductivos. Menos de dos décadas después, Claude Deshais-Gendron describió a los tumores cancerígenos como una masa fría formada por glándulas y nervios endurecidos, la cual se fijaba y crecía en los tejidos adyacentes [4]. Durante el siglo XVIII, John Hunter sugirió que el cáncer de mama se desarrolla debido a la coagulación defectuosa en los vasos linfáticos y propuso una nueva forma de cirugía, donde se extraía el tumor y la diseminación linfática. Entre otras teorías que surgieron en este siglo se encuentran, la de Giovanni Battista Morgagni que creía que la leche

cuajada era la causa de la enfermedad, Johannes de Gorter que la describe como una inflamación con gran contenido de pus y la explicación que más se acerca a lo que conocemos hoy en día fue dada por Henri Le Dran en 1757, él postuló al cáncer como una enfermedad local que avanza en estadios y no de manera sistemática, así mismo propuso que el tumor mamario debería ser removido antes de su propagación hacia los nódulos linfáticos axilares [5,6].

En 1838, Johannes Müller teorizó que las células cancerígenas provenían del crecimiento de células no diferenciadas y con la aportación de Robert Hooke quien introdujo el termino de *célula*, el medico alemán Rudolf Ludwig Karl Virchow, postuló que todas las células venían de otras células, quien, para 1858, publicó que las células axilares metastásicas se originaban como respuesta a ingredientes dañinos o materia venenosa emitida por el cáncer en la mama [7,8].

Los primeros indicios del tratamiento contra el cáncer se dieron en 1882, al introducir la mastectomía radical por el cirujano estadounidense William Halsted y con respaldo de los resultados de las cirugías de 50 pacientes con cáncer de mama, de las cuales sólo tres pacientes tuvieron concurrencia local, resultados excelentes al compararlos con las pacientes tratadas con técnicas convencionales, pues resultaron con concurrencias de más del 60%. También postuló la teoría llamada Virchow-Halsted, la cual dice que el cáncer es una enfermedad local, la cual hace metástasis a otros sitios conforme progresa [9]. En 1892, George Thomas Beatson, padre de la terapia antihormonal, declaró que, tras realizar ooforectomía a pacientes con tumores mamarios, se observaba una ligera disminución del tamaño de los tumores, por lo cual concluyó que la secreción interna de los ovarios estaba implicada en el desarrollo del tumor mamario. Gracias al desarrollo de los Rayos X, el cirujano alemán Albert Salomon publicó en 1913 los resultados de 3000 mastectomías en las cuáles encontró microcalcificaciones en imágenes tomadas de muestras de tumor y con ello pudo describir las diferencias en imagen de un tejido sano y uno con cáncer. Así mismo Geoffrey Keynes quien desaprobaba la mastectomía radical, sugirió una cirugía más limitada seguida por radioterapia, terapia que fue utilizada a comienzos de 1930 [5,10, 11].

El gas mostaza utilizado en la segunda guerra mundial fue sometido a estudios que mostraron toxicidad contra los linfomas. Ese fue el inicio de la investigación de agentes químicos capaces de matar células cancerígenas en crecimiento al dañar su ADN y para el año 1956 se cura el primer caso de cáncer metastásico utilizando un compuesto llamado metotrexato [12]. En la década de los 60's, Elwood Vernon Jensen, describió el receptor de estrógenos y también descubrió la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. La compañía ICI Pharmaceuticals, ahora AstraZeneca identificó en el compuesto químico ICI 46,474, un isómero trans de trifeniletieno llamado tamoxifeno que tras diversos estudios y en el año de 1977 la FDA aprobó su uso como tratamiento contra el cáncer de mama metastásico en los casos de tumores positivos a receptor de estrógeno (RE) [13]. En 1986 se aprobó su uso como terapia adyuvante para mujeres en postmenopausia y en 1998 se aprobó como profiláctico en mujeres con alto riesgo de cáncer de mama. Sin embargo, en uso a largo plazo se observaba un efecto agonista de estrógenos y demás efectos adversos, por lo cual la empresa empezó a buscar nuevos compuestos dando lugar al descubrimiento del compuesto ICI 182780 conocido como fulvestrant, el cual sería aprobado por la FDA en 2003 como una terapia endócrina de segunda línea para el tratamiento del cáncer metastásico con RE+ [5,14].

Por otro lado, gracias a movimientos sociales como, *Women and their bodies* de la organización feminista Boston Women's Health Collective, en 1979 los National Institutes of Health (NIH) concluyeron que la mastectomía radical no sería la única opción para el tratamiento del cáncer de mama y se propuso la mastectomía total y la mastectomía segmental con o sin radioterapia. En 1974 fue descubierto el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) que ha servido como blanco terapéutico contra el cáncer de mama por medio de inhibidores como el erlotinib, el gefitinib, el cetuximab y el afatinib, entre otros. En 1985 Bernard Fisher, propone al cáncer como una enfermedad sistémica en la cual las células cancerosas podían viajar por el sistema circulatorio y linfático hacía otras zonas del cuerpo, por lo que consideró tratar la enfermedad con lumpectomía seguida de radioterapia para obtener resultados iguales a la mastectomía radical [15,16,17].

En 1986 fue descubierto el gen ERBB2 y en 1987, Dennis Joseph Slamon demostró que se encontraba amplificado en el cáncer de mama, sobre todo en aquellas mujeres con un pobre pronóstico. Axel Ullrich demostró en 1989 que al dirigir un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de HER2, el producto de ERBB2, resultaba en la inhibición del crecimiento celular del cáncer de mama con sobreexpresión de este, así mismo produjo el primer anticuerpo contra la HER2 a partir de células de cáncer de ovario de hámster chino. En 1993 Douglas Easton descubrió el gen BRCA1 y en 1995 Wooster el gen BRCA2, ambos implicados con el desarrollo del cáncer de mama. En 1998 la FDA aprobó el uso de herceptin® en mujeres con cáncer metastásico en tumores con sobreexpresión de HER2 y en 2006 su uso para como parte de la terapia adyuvante para mujeres con cáncer de mamá HER2+ en estadios tempranos, otro fármaco aprobado para el mismo tipo de terapia fue el pertuzumab en 2012 [2, 5, 14].

Desde entonces y hasta la fecha se han seguido investigando nuevos compuestos que sean más selectivos a las células cancerígenas y más eficaces en la inhibición de su proliferación todo esto con el fin de poder ayudar como terapia contra el cáncer de mama.

1.2 USO DE COMPUESTOS BORADOS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA

El boro (B) es el quinto elemento de la tabla periódica y se sabe que es nutriente esencial para las plantas; el ser humano consume 0.3-4.2 mg de este elemento al día y se estima que la cantidad total en el cuerpo es de 3-20 mg, el cual se encuentra en los tejidos sanos en forma de ácido bórico o [18,19].

El boro en las moléculas orgánicas se presenta más comúnmente como ácido borónico, su pKa va de los 7-9, un poco más alto que el de los ácidos carboxílicos. A pH fisiológico, el ácido borónico está descargado y en la forma trigonal planar sp². A pH por encima de su pKa, un grupo hidroxilo se coordina con el orbital p vacío o también puede estar ocupado por un par solitario de otros nucleófilos, incluidos alcoholes y aminas, esto hace que se pueda formar un enlace dativo con nucleófilos biológicos,

como residuos de enzimas, incluida la serina, y grupos hidroxilo de carbohidratos y ácidos nucleicos [20].

El boro es un elemento poco estudiado en el área de la salud a comparación con otros elementos de su mismo grupo, sin embargo, cuenta con grandes potenciales de aplicaciones en dicha rama. Ejemplos de algunos compuestos en investigaciones son dutogliptina y Talabostat, ambos inhibidores de la Dipeptidil Peptidasa 4 y además de la proteína de activación de fibroblastos, este último en el año 2018 estaba en ensayos clínicos de fase III para cánceres de pulmón de células pequeñas [6]. Hasta el 2018 el único fármaco aprobado que contenía boro en su estructura era el Bortezomib (Velcade®), el cual es utilizado para el tratamiento de mieloma múltiple y leucemia, inhibiendo el proteosoma 26S. Sin embargo, este fármaco al igual que otros quimioterapéuticos tiene diversos efectos adversos y deben combinarse con demás fármacos. Hoy en día hay diversos compuestos en investigaciones los cuales tienen boro en su estructura. [21]

Se han reportados diversos estudios que mostraron efectos anticancerígenos de compuestos derivados de boro, algunas de estas estructuras tienen el poder de inhibir la proliferación de varios tipos de cáncer como el de pulmón, mama, cuello uterino, próstata, etc. Los efectos dependen del tipo de cáncer y algunos son; disminuir el riesgo de padecer la enfermedad al regular las hormonas esteroides, disminuir el proceso de proliferación de las células tumorales, aumentar los metabolitos anticancerígenos, inhibir la expresión de proteína ciclina, también pueden presentar efectos antioxidantes e inflamatorios al aumentar la expresión de estrógenos, previene la metástasis, etc. [19]

Además de eso, en los últimos años ha tenido un auge la Terapia de Captura de Neutrones de Boro (TCNB), la principal característica de esta terapia es la administración de compuestos que contengan B pero es su isotopo 10, que tengan alta afinidad a las células cancerígenas, ya que posteriormente a la administración del fármaco se realiza una sesión de radioterapia con lo que se busca irradiar con neutrones para que el ^{10}B para que se produzca una fisión, cuyo tamaño no supera los

9 μm , por lo que la célula afectada solo será la que contenga al boro, pues el tamaño de las células humanas más pequeñas es de 7-10 μm [22, 23].

Estos compuestos al igual que muchos fármacos son susceptibles a producir efectos adversos en los pacientes, sin embargo, esto mismo es la principal razón de que hoy en día se busquen nuevos compuestos que tengan alta selectividad, para que solo se produzca el efecto deseado y se presenten en menor cantidad y frecuencia efectos secundarios.

1.3 CÁNCER DE MAMA COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

Hoy en día el cáncer de mama es el más común en el mundo, por lo que, se convierte un problema de salud pública en México y en el resto del mundo, cada año se registran 685 mil defunciones por cáncer de mama, siendo entre los tumores malignos, la principal causa de muerte en las mujeres. En México durante 2019 se registraron 15,286 nuevos casos de cáncer de mama en la población de 20 años y más. De estos, 167 corresponden a hombres y 15,119 a mujeres. La tasa de incidencia de tumor maligno de mama a nivel nacional es de 18.55 casos nuevos por cada 100 mil habitantes de 20 años y más. A nivel nacional, la tasa de mortalidad por cáncer de mama es de 17.94 defunciones por cada 100 mil mujeres de 20 años y más. En los últimos años el cáncer de mama triple negativo ha afectado a mujeres de todas las edades, aunque, se ha reportado un incremento en la incidencia de la enfermedad en mujeres menores de 40 años, este tipo de cancer de los más difíciles de tratar y tiene peor pronóstico a comparación de otros tipos de cáncer de mama [1, 24]. Esto nos lleva a generar mayor investigación y desarrollo de terapias farmacológicas que sean más capaces, más eficaces y mejores dirigidas que las terapias actuales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 FISIOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA

En 1838, se descubrió que los tejidos cancerosos estaban formados por células con morfología alterada por lo que se propuso que la causa de la enfermedad era por lesiones celulares [5]. Hoy en día el cáncer se define como un desorden de células que se dividen anormalmente, esto produce los agregados de tejido que dañan a los adyacentes (figura 1), estas células pueden moverse a través del cuerpo e invadir tejidos lejanos aptos para su crecimiento, a esto se le conoce como metástasis y en muchas ocasiones es la principal causa de muerte por esta enfermedad [25]. El proceso de carcinogénesis origina la transformación de las células normales a células cancerosas, esto ocurre por alteraciones en el material genético (mutaciones) durante la división y replicación celular, las cuales le dan la propiedad de dividirse más rápidamente y así generar una descendencia que conserve tal mutación y esto ayuda a presentar mayor capacidad de sobrevida y crecimiento [26].

El sistema inmune, gracias a la inmunovigilancia tumoral, es capaz de eliminar las células tumorales, sin embargo, algunas pueden adquirir ciertas peculiaridades para evadir este mecanismo de control, y así generar el crecimiento descontrolado de las células anormales, proceso conocido como neoplasia [27]. A los genes homólogos a genes retrovirales relacionados previamente con el desarrollo de tumores se les conoce como protooncogenes y ayudan al crecimiento y proliferación de células normales, cuando estos se encuentran con mutaciones se les denomina oncogenes, su mutación es de tipo dominante y en las células se traduce como aumento de sobrevida y proliferación [28]. Existen genes supresores de tumores, los cuales regular la proliferación, reparación y muerte celular programada, las mutaciones en estos genes se traducen en una pérdida de su función y de las proteínas que codifican, esto genera una falla en los mecanismos de control y reparación internos de la célula, permitiendo su proliferación y crecimiento descontrolados [29].

El mecanismo por el cual se pierde la copia normal del gen se ha denominada pérdida de heterocidad o LOH y generalmente los tumores con alta incidencia de esto se relacionan con un pronóstico desfavorable. Existen alrededor de 153 genes que ayudan en la reparación de ADN, entre los principales mecanismos están la reparación de mal pareamiento, reparación por escisión de base o nucleótido, unión de extremos no homólogos y recombinación homóloga [25]. En el caso del cáncer de mama y ovario algunos de los genes de reparación de ADN son los BRCA 1 y 2, las mutaciones en estos genes y otros más hacen a las células más sensibles a los factores que dañan el ADN y a la adquisición y acumulación de nuevas mutaciones que favorecen la carcinogénesis [2]. Tales mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas de *novo*, por carcinógenos o virus oncogénicos [30].

En las células normales existen varios mecanismos para regular las mutaciones espontaneas (detención del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis de células muy dañadas). La inestabilidad genómica y la inflamación tumorigénica son los principales factores que promueven y hacen que persistan en las células las mutaciones iniciadoras de tumores, la inestabilidad genómica se presentan grandes aberraciones cromosómicas y cambios en la ploidía [18]. En particular la proteína p53 cumple un rol fundamental, pero este se encuentra mutado en el 50 % de los tumores humanos, lo cual provocan división celular descontrolada, inhibición de apoptosis y metástasis a órganos distantes [2]. El síndrome de Li-Fraumeni en el cual se hereda un alelo mutado y uno funcional de p53, está relacionado con alta incidencia en el cáncer de mama. Así mismo la inestabilidad genómica también se puede presentar como la pérdida de ADN de los telómeros, inestabilidad microsatelital, etc. Esto conduce a un aumento en la probabilidad de que ocurran mutaciones en oncogenes que generan las capacidades que mejoran su sobrevida [31].

Las células del sistema inmune son las encargadas de la inmunovigilancia tumoral, pero durante este proceso se produce un estado de inflamación crónica y dicha inflamación promueve la iniciación tumoral al generar un estrés genotóxico, lo que genera la

inducción de la proliferación y progresión tumoral lo que facilita el desarrollo de la metástasis [32, 33].

En el año 2011, gracias a la literatura disponible se llegó a descubrir y acordar 8 características que todas las células tumorales poseen:

- Independencia de señales de crecimiento

La alta proliferación de las células tumorales se debe a cualquiera de los mecanismos que se mencionan a continuación: síntesis o estimulación en sus células vecinas la síntesis de ligandos similares a los factores de crecimiento, expresión de nuevos receptores de membrana que responden a señales proliferativas, aumento en la expresión de receptores de tirosina quinasa [34].

- Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento

Las células tumorales también evaden los mecanismos de regulación negativa de la división celular, entre las mutaciones más comunes se encuentran dos genes, los asociados a retinoblastomas (RB), que deciden si la célula está en apta para progresar en el ciclo celular en la transición G1/S. Y p53, el cual se encarga de secar distintas formas de estrés intracelular activando dos vías de respuesta, una es igual a la de RB y la otra es la apoptosis, si el gen p53 esta mutado da lugar a la tumorigénesis al perderse su actividad supresora de tumores [25, 35].

- Evasión de apoptosis

La apoptosis se da por diversos estímulos que culminan con la activación de las caspasas, en las células humanas existen dos vías para llevar a cabo la apoptosis, la extrínseca dada por receptores de muerte e intrínseca que es una vía mitocondrial. Las células tumorales desarrollan mecanismos para evadir la apoptosis como la alteración en el balance de proteínas pro y anti apoptóticas, disminución de la actividad de las caspasas y la pérdida o falla en la señalización de receptores de muerte [36].

- Invasión y metástasis

Las células tumorales con capacidad invasiva cambian por un proceso llamado transición epitelio-mesenquimática (TEM), en el cual, las células pierden sus uniones adherentes y aumentan su motilidad [6]. En la metástasis el tumor empieza con una invasión local, algunas células se introducen al sistema linfático o sanguíneo para viajar a órganos distantes con las condiciones de crecimiento adecuadas y formando nuevos tumores, proceso llamado como cascada invasión-metástasis. En cáncer de mama sólo el 0.01 % de las células que salen efectivamente a circulación podrían producir una metástasis ósea, y al menos 10,000 de estas células se requieren para el desarrollo de una metástasis exitosa. [37]

- Activación de un potencial de replicación inmortal

Las células tumorales pueden expresar la proteína telomerasa, una ADN polimerasa que adiciona segmentos repetitivos a los extremos del ADN telomérico, evitando su acortamiento y también por mutaciones del gen p53 pueden evitar la crisis celular, la muerte y el límite de Hayflick (límite de división celular), por lo que estas células se pueden volver inmortales. [34]

- Angiogénesis sostenida

La estimulación de la angiogénesis favorece el crecimiento tumoral y la metástasis, está regulada por diversas vías que mantienen un balance en las moléculas anti y pro angiogénicas, la pérdida de este balance en los tumores favorece su crecimiento y este a su vez hipoxia que sirve como estímulo para la producción de citoquinas angiogénicas como VEGF, factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-g), etc. [18].

- Reprogramación del metabolismo energético

El efecto Warburg es una reprogramación hacia la glucólisis a pesar de tener oxígeno disponible y suficiente, este efecto está presente en las células cancerígenas, algunas de las consecuencias de este efecto es la acidificación del área tumoral, lo que promueve la muerte de las células normales e impidiendo la respuesta inmunitaria

contra el tumor en el área acidificada y facilitando así los mecanismos de crecimiento agresivo del cáncer [38].

- Evasión de la destrucción inmune

Las células cancerígenas son reconocidas por el sistema inmune por la expresión de proteínas distintas a una célula normal, pero este reconocimiento no es tan sencillo ya que por ser células de la misma persona existe inmunotolerancia, por eso algunas células logran entrar a un proceso de inmunoección y gracias a ello pueden seguir proliferando y creciendo sin ningún tipo de impedimento de inmunovigilancia.



Figura 1. Comparación de células mamarias normales (izquierda) y las células mamarias tumorales (derecha). Tomado de [39].

2.2 TIPOS DE TUMORES EN CÁNCER DE MAMA

El Dr. Charles M. Perou y colaboradores publicaron en la revista Nature en el año 2000 la clasificación del cáncer de mama que se utiliza actualmente para diagnosticar que tumores son más agresivos que otros basándose en el estado de los receptores hormonales (+/-) que tienen las células tanto en superficie como en el citoplasma y

núcleo, la amplificación o sobreexpresión de HER2 y el marcador de proliferación Ki67 (tabla 1). Según los perfiles de expresión genética se pueden clasificar 4 subtipos de este cáncer, el luminal A, el luminal B, HER2 o ErbB2 positivo y Triple Negativo [2, 40]. Aunque hoy en día esta clasificación sigue siendo de suma importancia, el auge y avances en la biología molecular, ha permitido mejores perspectivas para el abordaje de las terapias prediciendo la respuesta de los tratamientos sistemáticos [41]. También pueden clasificarse histológicamente como *in situ* (ej. Carcinoma ductal y carcinoma lobulillar) o invasivo (carcinoma ductal invasivo y lobulillar invasivo).

- Luminal A

Cuenta con receptores positivos para estrógeno y progesterona, constituye del 50-60 % de los casos, es el subtipo con mejor pronóstico, presenta una favorable respuesta a la hormonoterapia y un beneficio más limitado a la quimioterapia [40].

- Luminal B

Constituye el 10-20 % de los tumores luminales y se subdivide en 2 tipos, el HER2 positivo, el cual responde bien a inmunoterapia y terapia hormonal. Y el HER2 negativo, el cual se asocia a alto de proliferación celular, cuenta con receptores positivos para estrógeno y progesterona lo que lo hace responder bien a la terapia hormonal [42].

- HER positivo

No cuenta con receptores positivos para estrógeno y progesterona, es un tipo con pronóstico peor al compararlos con los luminales, su tratamiento se basa en inhibir HER2 y a la tirosina quinasa y es el grupo que más frecuentemente afecta al sistema nervioso central en las recaídas [40].

- Triple Negativo (CMTN)

El presente trabajo se enfoca en este tipo de cáncer de mama, el cual representa alrededor de 10-15 % de los tumores mamarios, este tipo no cuenta con ninguno de los tres receptores (estrogénicos, progestágenos y HER2), de ahí que se llame triple negativo, por lo que las terapias convencionales son nulas o ineficientes para tratarlo

pero en general responde bien a quimioterapias, aunque pueden recaer fácilmente, la sobrevivencia de pacientes con este tipo de cáncer de mama está entre el 5-20 % luego de 5 años de seguimiento a partir de su pronóstico [41, 43]. Actualmente es el tipo más estudiado y por ende se han descubierto o caracterizado diferentes subtipos, los cuales tienen características y agresividad diferentes, por lo que realizar estudios para determinar nuevas dianas farmacológicas es el reto que hoy en día se tiene. Entre los más destacados se encuentran los Basal Like (BL), Inmunoenriquecidos (IM), Mesenquimales (M) y el subtipo llamado receptor de endógeno luminal (LAR). De igual manera existen más subtipos que son más especiales o raros.

Tabla 1. Características de los subtipos de cáncer de mama. Tomado de [40]. RE: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona.

Subtipos de cáncer de mama				
Luminal A-like	Luminal B- like		Triple negativo	HER positivo
RE positivo	RE positivo	RE positivo	RE negativo	RE negativo
RP ≥ 20 %	RP ≥ 20 %	RP +/-	RP negativo	RP negativo
HER2	HER2 negativo	HER2 positivo	HER2 negativo	HER2
Ki67 < 20 %	Ki67 > 20 %			

Con la biología molecular, la inmunohistoquímica y las nuevas técnicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) se han podido obtener mejor caracterización y subclasificación del CMTN. En la tabla 2 se muestra algunos subtipos de CMTN, reportados y caracterizados en un artículo publicado en 2020 por el Departamento de Patología y Universidad Médica de Tianjin en China, en la cual se observan si son positivas y negativas a ciertos receptores y algunas otras características como la edad en la que más se presentan, tamaño, genes mutados, entre otras.

Tabla 2. Subtipos de CMTN y sus principales características. Tomado de [44]. RE: Receptor de estrógeno. RP: Receptor de progesterona. RA: Receptor Andrógeno.

Variable/ Población	Carcinoma quístico adenoide	Carcinoma a secretor	Carcinoma de células acínicas	Carcinoma con diferenciación apocrina	Carcinoma surgido en la adenosis micro glandular
RE	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
HER2	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo/ Negativo	Negativo
RA	---	---	Negativo	Positivo	---
Rango de edad media	64 años (50-78 años)	25 años (3-87 años)	56 años (35-80 años)	---	55 años (50-60 años)
Lugar (%)	Subareolar	Cerca de la areola	---	---	---
Tamaño de tumor (media)	0.5-12 cm (3 cm)	0.5-12 cm (3 cm)	1-5 cm	---	Típicamente una lesión microscópica
Translocación cromosómica	t (6;9) (q22- 23; p23-24)	t (12; 15)	---	Incremento de 1p, 1q, 2q, perdida de 1p, 12q, 16q, 17q	Incremento de 8q y pérdida de 5q
Combinación/ mutación de genes	MYB, NFIB	ETV6- NTRK3	TP53, MLL3, FOXA1	RA	---
Propiedades biológicas malignas	Maligno de bajo grado	Maligno de bajo grado	Maligno de bajo grado	---	Incierto

Pronóstico	Tasa de sobrevida a 10 años > 90 %	Favorable en pacientes menores de 20 años	Favorable	Relativamente pobre	Incierto
-------------------	------------------------------------	---	-----------	---------------------	----------

2.3 TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER DE MAMA

Gracias a los descubrimientos realizados a través de la historia de la patología del cáncer de mama, se ha podido combatir esta enfermedad de manera cada vez más eficiente y efectiva. Se ha pasado de las cirugías mutilantes y agresivas como la extirpación del seno en su totalidad o mastectomía radical a las cirugías menos invasivas y más controladas [40]. También se han introducido más opciones de tratamientos como las radioterapias, quimioterapia, hormonoterapias, inmunoterapias y nuevas terapias emergentes y mejor dirigidas (figura 2). Los tratamientos dependen de que tan avanzada este la enfermedad, a esto se le conoce como estadios (I, II, III y IV), mientras más bajo sea el número, menos se ha propagado el cáncer, siendo el IV el más avanzado y grave. Estas etapas se determinan más comúnmente por el sistema de estadificación TNM (tumor, nódulo, metástasis) del American Joint Committee on Cancer (AJCC), la cual incluye etapas patológicas y clínicas. En ambas se busca categorizar, la extensión del tumor, propagación a los ganglios linfáticos adyacentes, la propagación a sitios distantes, estados de receptores de estrógeno, progesterona y HER2 [45].

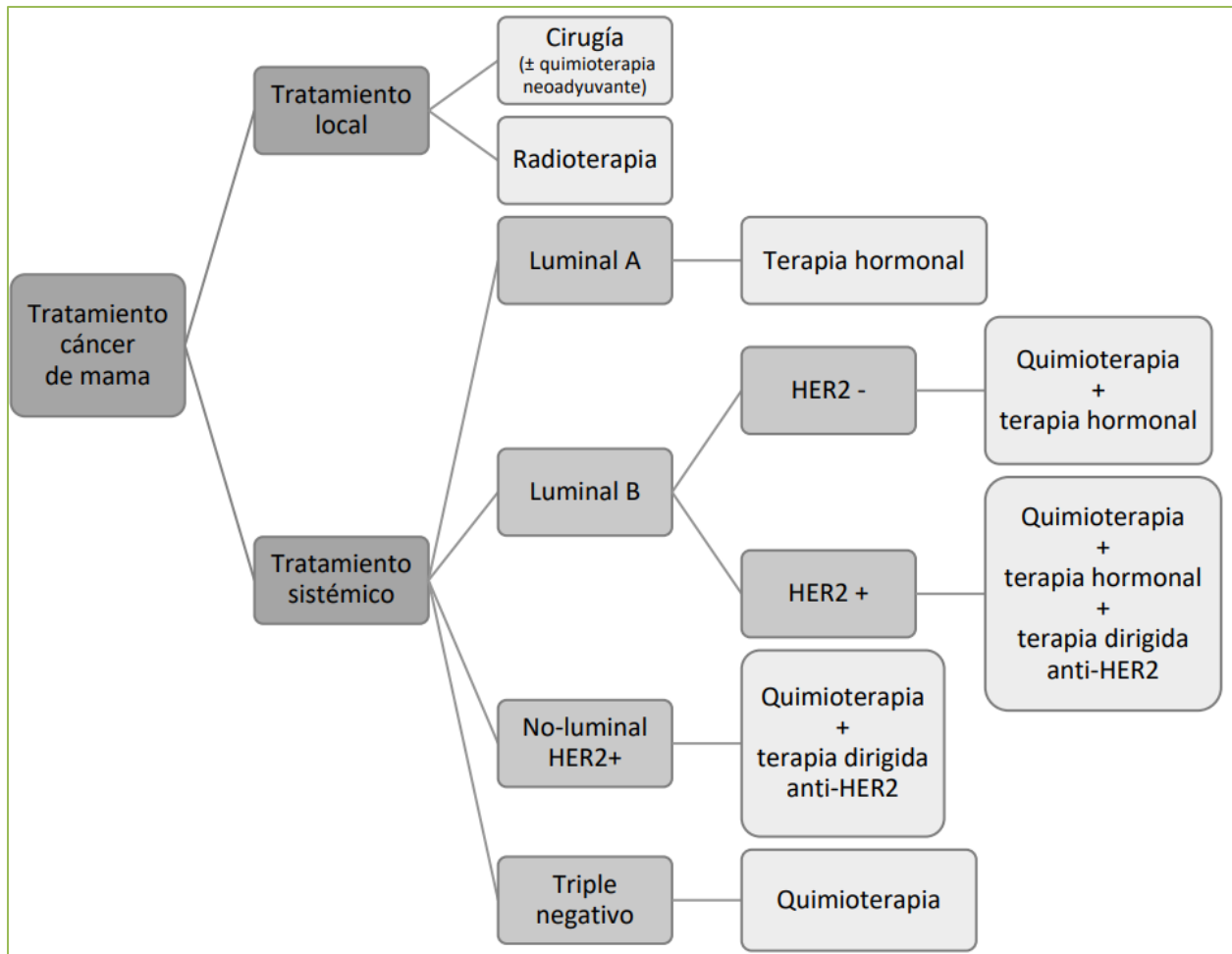


Figura 2. Posibles tratamientos al cáncer de mama. Tomado de [46]

- Radioterapia

El uso de esta terapia depende del tamaño del tumor, si está en fase metastásica y de una probable cirugía, aquí se utilizan partículas o rayos de alta energía para matar células cancerígenas y así reducir los tumores. Los principales tipos de radioterapia que se utilizan para el tratamiento del cáncer de mama son radioterapia externa y braquiterapia [2].

- Quimioterapia

Entre los fármacos más empleados se encuentran la doxorubicina, epirubicina, paclitaxel, docetaxel, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida y el carboplatino. Existen la forma de administración adyuvante que es la que se da después de un tratamiento quirúrgico

y así evitar recaídas y remover células remanentes. La forma de administración neoadyuvante que se da antes y sin hacer cirugía [47].

- Hormonoterapia

Se utiliza en mujeres que padecen cáncer de mama con receptores positivos (ER y/o PR y esta consiste en inhibir la acción de las hormonas a nivel tumoral, esto se puede lograr por dos vías, bloqueado la producción de las hormonas o su acción a nivel celular. Las ventajas que tiene esta terapia es que la respuesta del tumor es más sostenida y con menor índice de recaída [46]. Los medicamentos más empleados son el tamoxifeno y los inhibidores de la aromatasa.

- Terapias dirigidas biológicamente

Se basa en incrementar la respuesta inmune sobre las células cancerígenas a través de diversos mecanismos, los cuales siguen en desarrollo y por ende no hay tantos tratamientos de este tipo. Entre los mecanismos se encuentran el uso de anticuerpos monoclonales (Trastuzumab, Bevacizumab, Atezolizumab, etc.), vacunas de terapia genética, inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR, inhibición de tirosina-quinasa, etc. [44, 47, 48].

2.4 COMPUESTOS PROBADOS

Se utilizaron cuatro compuestos borados (figura 3): ácido bórico (A1), ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37), ácido fenantren-9-il borónico (A46) y ácido 9H-fluoren-2-il borónico (A57). Se utilizó el fármaco doxorubicina Accord (DOXO) como molécula control positivo ya que las células tumorales son sensibles a este fármaco.

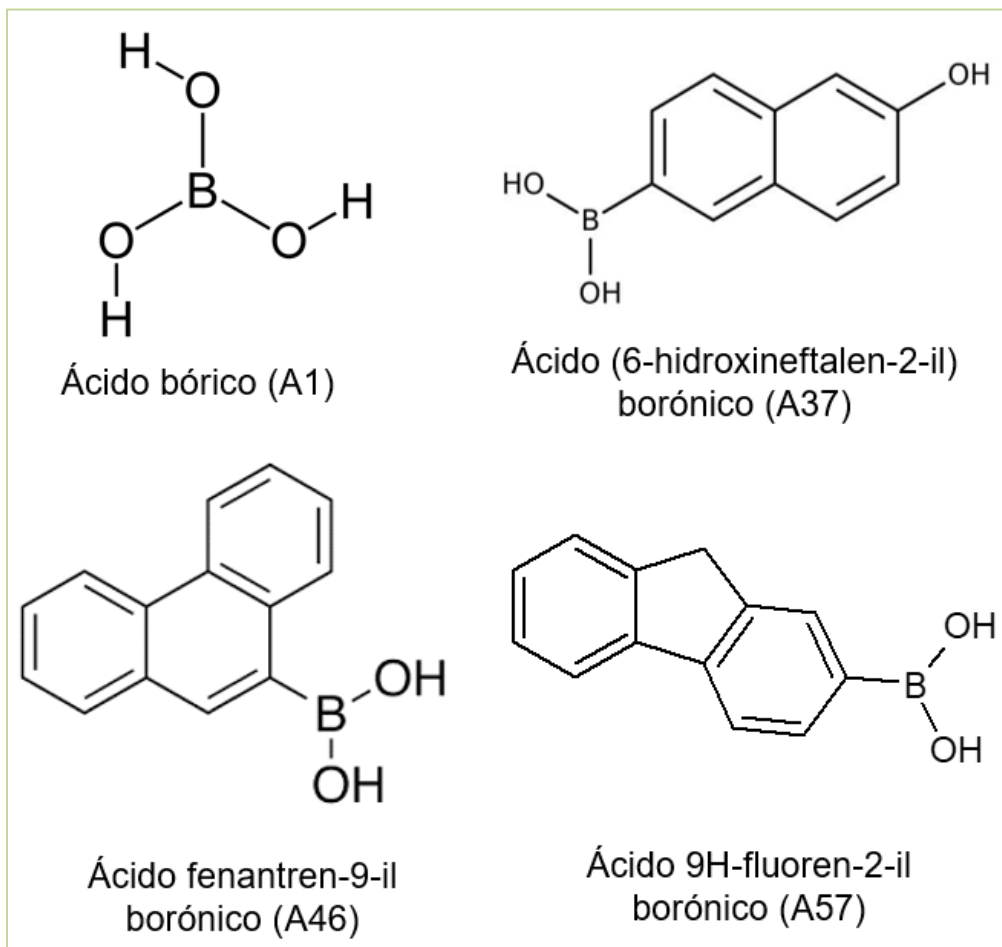


Figura 3. Estructura química, nombre IUPAC (nombre clave de identificación) de los compuestos utilizados.

- Ácido bórico (A1)

(H₃BO₃) Tiene propiedades antisépticas, antifúngicas y antivirales leves. Se desconoce el mecanismo exacto de acción del ácido bórico por lo general es citotóxico para muchas células [21]. Es un sólido blanco inodoro, tiene un peso molecular (PM) de

61.82 g/mol, una densidad de 1.5 g/mL y una solubilidad de 5 g/L de agua a 25 °C, pero también es soluble en glicerol, metanol, etanol, acetona, etc [49].

- Ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37)

(C₁₀H₉BO₃) Es un sólido blanco inodoro, su PM es de 187.99 g/mol, no se reportan datos de solubilidad, densidad y punto de fusión, etc [50]. En los experimentos realizados para este trabajo no presentó solubilidad en agua, ni en los medios de cultivo celulares, pero si resultó soluble en metanol.

- Ácido fenantren-9-il borónico (A46)

(C₁₄H₁₁BO₂) Es un sólido blanco inodoro, tiene un PM igual a 222.05 g/mol, tampoco se reportan datos de las propiedades químicas y físicas como solubilidad, densidad y otras más [51]. No se pudo disolver en agua ni en los medios de cultivo celular, sin embargo, también presentó solubilidad en metanol.

- Ácido 9H-fluoren-2-il borónico (A57)

(C₁₃H₁₁BO₂) Es un sólido blanco inodoro, su PM es de 210.4 g/mol, no se reportan datos de sus propiedades fisicoquímicas. [52]. Al igual que los compuestos anteriores no se disolvió en agua, solo presentó solubilidad en metanol en cantidad menor a los dos anteriores, pero la necesario para realizar los experimentos.

En la tabla 3 se observan algunos datos encontrados en PubChem para los compuestos utilizados.

Tabla 3. Características químicas de los compuestos empleados.

Compuesto	PM (g/mol)	Log P	Log S	Donador H	Receptor H
Ácido bórico	61.82	0.175		3	3
Ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico	187.99	2.23	-0.20	3	3
Ácido fenantren-9-il borónico	222.05	3.77	-0.20	2	2
Ácido 9H-fluoren-2-il borónico	210.4	3.40	-1.61	2	2

2.5 DOXORRUBICINA

Para estos experimentos se utilizó hidrocloreuro de doxorubicina (figura 4) de Doxorubicina Accord 2 mg/ml concentrado para solución para perfusión EFG, la cual se presenta en una solución transparente, de color rojo, con un pH comprendido entre 2.5 y 3.5. Los excipientes que contiene el medicamento son el cloruro de sodio, ácido clorhídrico (para el ajuste del pH) y agua para preparaciones inyectables [53].

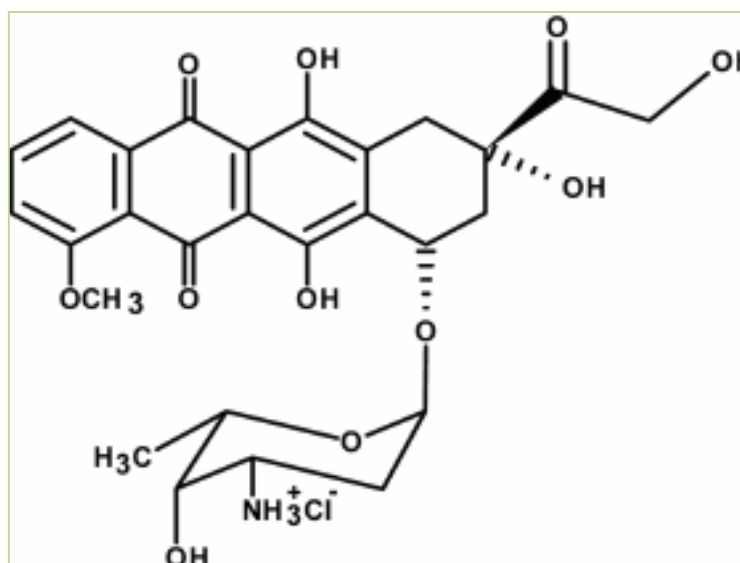


Figura 4. Estructura química de hidrocloreuro de doxorubicina (DOXO).

Su fórmula química es $C_{27}H_{30}ClNO_{11}$, tiene un PM de 579.98 g/mol. Es un medicamento perteneciente a la familia de las antraciclinas, es usado para tratar diversos tipos de cáncer entre ellos el cáncer de mama, aunque aún no se sabe con exactitud el mecanismo de acción, se postula que ejerce su efecto antineoplásico por la intercalación en el ADN, la inhibición de la enzima topoisomerasa II y la formación de especies reactivas de oxígeno.

El grado de unión a proteínas es del 60-70%. Se elimina rápidamente de la sangre y se distribuye ampliamente por los tejidos como pulmones, hígado, corazón, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y riñones. [54]

2.6 CULTIVO CELULAR

El cultivo celular empezó en el año de 1907, por el investigador Dr. Ross Harrison cuando realizó su experimento para determinar cómo se formaban las fibras nerviosas [55] y desde entonces esta técnica han tomado un rol muy importante en la investigación científica, ya que permite observar a detalle los procesos y componentes de una célula, además se puede probar moléculas de interés farmacológico, en aplicaciones biotecnológicas, ingeniería de tejidos, etc. El cultivo celular se logra gracias a las metodologías existentes para aislar celular de un mismo tipo a partir de un tejido y así obtener poblaciones de celulares homogéneas, a este tipo de ensayos se les llama como *in vitro* (figura 5).

La mayoría de las células animales y vegetales aisladas pueden vivir, multiplicarse y presentar características diferenciales si se les cultiva con medios adecuados. Existen diferentes medios de cultivo y el uso de estos depende de las características de las células que se van a cultivar y utilizar, del experimento que se va a realizar, etc. La composición de los medios está dada por aminoácidos esenciales, vitaminas, sales, antibióticos y/o antimicóticos, ajustadores de pH, glucosa, ciertas proteínas que le dan la característica de los factores de crecimiento específicos, y algunos otros compuestos específicos según lo requiera el cultivo. Así como el medio los contenedores para el cultivo pueden ser de distintos tipos y estos dependen de las características de la célula y las escalas del experimento [56].

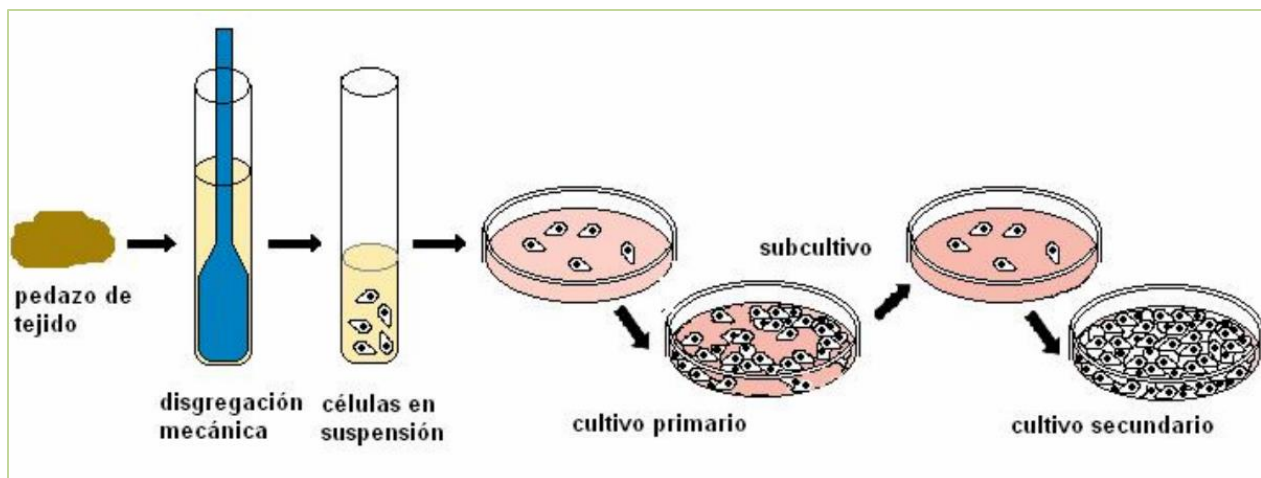


Figura 5. Cultivo celular. Tomado de [55].

Existen cultivos primarios y secundarios, los primarios son aquellos preparados directamente del tejido u órgano, en estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada y de estos se pueden derivar o hacer los cultivos secundarios. En los cultivos secundarios las células pueden multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses [55].

2.7 INTERACCIONES ENTRE FÁRMACOS

La terapia farmacológica múltiple puede presentar riesgos y/o beneficios ya que los fármacos utilizados pueden presentar interacciones entre sí, algunas cosas que podrían presentar son: disminuir en la eficiencia terapéutica, aumentar el riesgo de toxicidad, aumentar el efecto farmacológico, entre otros. Las interacciones farmacológicas suceden cuando un fármaco ejerce una acción sobre otro, de modo que este ejerce un cambio cuantitativo o cualitativo en sus efectos, esto puede provocar, que exista antagonismo, aditividad o sinergismo. Cuando se presenta antagonismo entre fármacos, estos bloquean sus efectos entre sí, ya que a la misma dosis se presenta un efecto menor al que se presentaría estando solo, en la aditividad solo suman sus efectos y en el sinergismo existe un efecto mayor que al efecto que se tendría si se combinan los dos fármacos [57, 58]. Estas interacciones son estudiadas que ya pueden beneficiar a la terapia farmacológica de ciertas enfermedades y del mismo modo utilizar los fármacos de una manera apropiada.

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama tiene la mayor tasa de incidencia a nivel mundial y aunque existen diversos fármacos y terapias, estos tienen numerosos efectos secundarios, debido a esto, se continúan buscando nuevos tratamientos con menores efectos adversos. En los últimos años se ha sugerido que, moléculas que contienen boro en su estructura, pueden presentar importantes efectos anticancerígenos, por lo que este trabajo pretende caracterizar moléculas boradas con potencial efecto inhibitorio de la proliferación de células de cáncer de mama, que sean eficaces, potentes y selectivas.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos ácido bórico (A1), ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37), ácido fenantren-9-il borónico (A46) y ácido 9H-fluoren-2-il borónico (A57) son citotóxicos e inducen la inhibición de la proliferación de células 4T1 sin tener un efecto negativo significativo en células normales

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Evaluar la actividad anti proliferativa de cuatro compuestos borados en una línea celular murina de cáncer de mama triple negativo (4T1)

5.2 PARTICULARES

1. Comparar las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) de los compuestos borados A1, A37, A46 y A57 en células 4T1.
2. Identificar selectividad de los compuestos para la inhibición de la proliferación de células cancerosas.
3. Evaluar interacciones farmacológicas de los compuestos probados con doxorubicina.

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS

Se utilizó la línea celular 4T1 (ATCC-CRL-2539) como línea celular tumoral (figura 6), la cual es un modelo singénico y se obtiene de tumores en ratones BALB/c hembras nulíparas maduras de 6-8 semanas de edad, el crecimiento tumoral y metástasis de estas células son muy semejantes a las de cáncer de mama humano, una característica de este linaje es que se pueden trasplantar y posteriormente hacer metástasis espontánea agresiva vía hematógena por lo que es un buen modelo de estadio IV de cáncer de seno. Para un correcto y mejor uso de esta línea celular se recomienda usar medio RPMI y no dejar que se supere una confluencia del 80 % [59, 60].

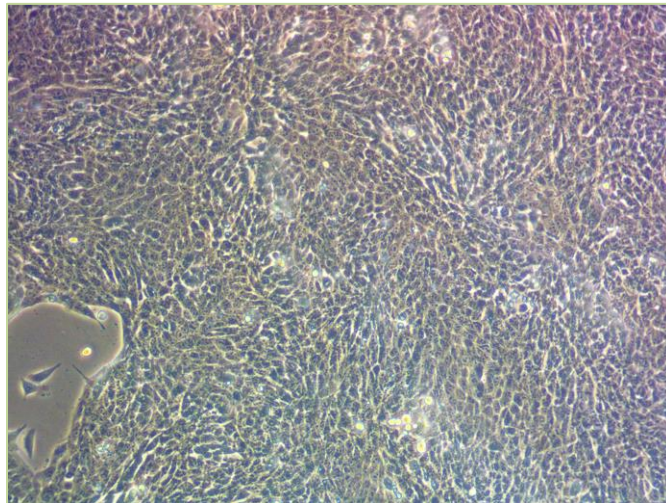


Figura 6. Células 4T1 en cultivo con una confluencia del 80 %.

También se utilizó la línea celular C2C12 (ATCC-CRL-1772) como línea celular no tumoral (figura 7), su origen es mioblastoide de ratón inmortalizada y son un subclon de la línea celular establecida por D. Yaffe y O. Saxel, Esta línea celular se diferencia rápidamente, formando miotubos contráctiles y produciendo proteínas musculares características [61]. Para un correcto y mejor uso de esta línea celular se recomienda usar medio DMEM y no dejar que se supere una confluencia del 80 %, para evitar la

formación de miotubos [62]. Para los experimentos desarrollados en este trabajo, las células C2C12 se utilizaron como control y averiguar si los compuestos no afectaban a células no tumorales.

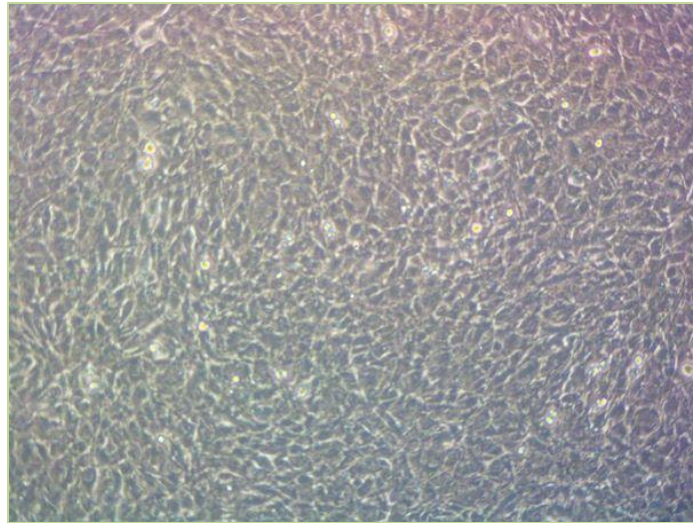


Figura 7. Células C2C12 en cultivo con una confluencia de 80%

Ambas líneas celulares se tomaron de un stock cultivo primario, estas se mantuvieron en subcultivos en cajas en T con una superficie de 75 cm² para realizar todos los experimentos necesarios, ambas líneas celulares se mantenían en una incubadora en condiciones bajo una atmosfera que contenía 5 % de bióxido de carbono (CO₂) y a una temperatura de 37 °C. Todo lo utilizado para el medio de cultivo fue de la marca biowest. El medio de cultivo utilizado para las células 4T1 fue el RPMI 1640 y para las células C2C12 el medio de cultivo fue DMEM F-12, ambos medios fueron suplementados con suero bovino fetal (SBF) al 10 % y 1 % de antibiótico (penicilina-estreptomicina).

Una vez se alcanzó una confluencia del 70-80 % de las cajas en T de 75 cm², se procedió a pasar las células a cajas de 96 pozos, cada pozo cuenta con área de 0.32 cm². Primeramente, se retiró el medio de las cajas en T de 75 cm², posteriormente se agregaron 7 mL de tripsina al 0.25 % en solución de HBSS, se dejó reposar por 15 minutos en la incubadora. Pasado el tiempo se pasó el contenido de la caja en T a un

tubo cónicos de 15mL, se llevaron a un volumen de 10 mL con más medio de cultivo para detener el efecto de la tripsina y se centrifugaron a 3000 rpm por 3 minutos.

Terminando la centrifugación se observó la formación de un botón de células al fondo del tubo, el medio de cultivo se retiró por decantación, con el remanente de medio se resuspendió el botón de células dando pequeños golpes con el dedo al tubo, posteriormente se le agregó de medio de cultivo para llevarlo a un volumen total de 5 mL. De este stock de células se tomó una muestra de 10 μ L para cuantificar las células en una cámara de Neubauer, se realizó el conteo de las células presentes por cuadrante y se sacó el promedio de los cuatro cuadrantes. Al promedio se le multiplicó por el factor de la cámara que es de 10,000 y esa es la cantidad de células existentes por cada mL del stock de células.

Se sembraron un aproximado de 5×10^3 células por cada pozo de las cajas de 96 pozos, para esto se tomó la cantidad de μ L necesaria del stock ya cuantificado, los pozos se llevaron a un volumen total de 150 μ L de medio correspondiente según la línea celular, esto se dejó incubando por 24 horas para que las células de adhirieran a la superficie.

6.2 ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS CON LOS COMPUESTOS BORADOS

- Curva de concentraciones

Se realizaron soluciones madre de cada uno de los compuestos, para esto, en tubos cónicos de 1.5 mL se pesaron 10 mg de cada uno de los compuestos, los cuales se diluyeron en un volumen de 500 μ L de metanol. Para las diluciones se tomó el volumen necesario de la solución madre y se completó con medio de cultivo suplementado a un volumen total de 1,000 μ L para alcanzar las concentraciones que se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Compuestos y sus concentraciones utilizadas en la estimulación de las líneas células 4T1 y C2C12.

Compuesto	A1	A37	A46	A57	DOXO
Concentraciones en μM	0.1	0.1	0.1	0.0001	0.00001
	0.2	0.2	0.2	0.001	0.0001
	0.4	0.3	0.3	0.01	0.001
	0.6	0.4	0.4	0.1	0.01
	0.8	0.5	0.5	1.0	0.1
	1.0	0.6	0.6	10	1
	1.2	0.7	0.7	100	10

Pasado el tiempo de adherencia de las células a las cajas de 96 pozos se procedió a retirar el medio de cultivo, cada pozo fue estimulado con 150 μL . Se estimularon 6 pozos por cada una de las concentraciones de los compuestos, 3 pozos como control y 3 pozos como vehículo, el cual contiene la mayor concentración de la sustancia que se utilizó como solvente para los compuestos. Se dejaron incubando por 5 días y se realizaba un cambio de medio cada tercer día (tabla 5).

Tabla 5. Representación de la estimulación en la caja de 96 pozos con los compuestos borados para la curva de concentración.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CONTROL	CONTROL	CONTROL	VEHÍCULO	VEHÍCULO	VEHÍCULO	CONTROL	CONTROL	CONTROL	VEHÍCULO	VEHÍCULO	VEHÍCULO
B	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1	Concen 1
C	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2	Concen 2
D	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3	Concen 3
E	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4	Concen 4
F	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5	Concen 5
G	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6	Concen 6
H	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7	Concen 7
	COMPUESTO 1						COMPUESTO 2					

- Curvas de interacciones farmacológicas

Con los datos de las gráficas concentración-efecto se obtuvieron las CI_{40} y CI_{35} del compuesto A37, A46 y DOXO, se utilizó una relación 1:1 y se hicieron dos diluciones de ellas las cuales se utilizaron para la estimulación de las células 4T1.

Pasado el tiempo de adherencia de las células a las cajas de 96 pozos se procedió a retirar el medio de cultivo, cada pozo fue estimulado con 150 μ L. Se estimularon 5 pozos por cada una de las combinaciones de los compuestos y 5 pozos como control. Se dejaron incubando por 5 días y se realizaba un cambio de medio cada tercer día. Los ensayos se hicieron por triplicado (tabla 6).

Tabla 6. Representación de la estimulación en la caja de 96 pozos para las curvas de sinergismo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B							[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	
C		Control	Control	Control	Control	Control	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	
D		[DOXO+A37]	[DOXO+A37]	[DOXO+A37]	[DOXO+A37]	[DOXO+A37]	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	
E		[DOXO+A37]/2	[DOXO+A37]/2	[DOXO+A37]/2	[DOXO+A37]/2	[DOXO+A37]/2	[A37]	[A37]	[A37]	[A37]	[A37]	
F		[DOXO+A37]/4	[DOXO+A37]/4	[DOXO+A37]/4	[DOXO+A37]/4	[DOXO+A37]/4	[A37]/2	[A37]/2	[A37]/2	[A37]/2	[A37]/2	
G							[A37]/4	[A37]/4	[A37]/4	[A37]/4	[A37]/4	
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B							[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	[DOXO]	
C		Control	Control	Control	Control	Control	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	[DOXO]/2	
D		[DOXO+A46]	[DOXO+A46]	[DOXO+A46]	[DOXO+A46]	[DOXO+A46]	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	[DOXO]/4	
E		[DOXO+A46]/2	[DOXO+A46]/2	[DOXO+A46]/2	[DOXO+A46]/2	[DOXO+A46]/2	[A46]	[A46]	[A46]	[A46]	[A46]	
F		[DOXO+A46]/4	[DOXO+A46]/4	[DOXO+A46]/4	[DOXO+A46]/4	[DOXO+A46]/4	[A46]/2	[A46]/2	[A46]/2	[A46]/2	[A46]/2	
G							[A46]/4	[A46]/4	[A46]/4	[A46]/4	[A46]/4	
H												

6.3 ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

- MTT

El Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, es soluble en agua y de un color amarillo, éste se utiliza en un ensayo que deja observar la actividad metabólica (figura 8) de las células y así determinar su viabilidad, al presentarse una reducción de MTT por la enzima succinato-deshidrogenasa en un formazano de color violeta e insoluble en agua el cual se puede cuantificar por espectrofotometría a una longitud de onda de 590nm [63, 64].

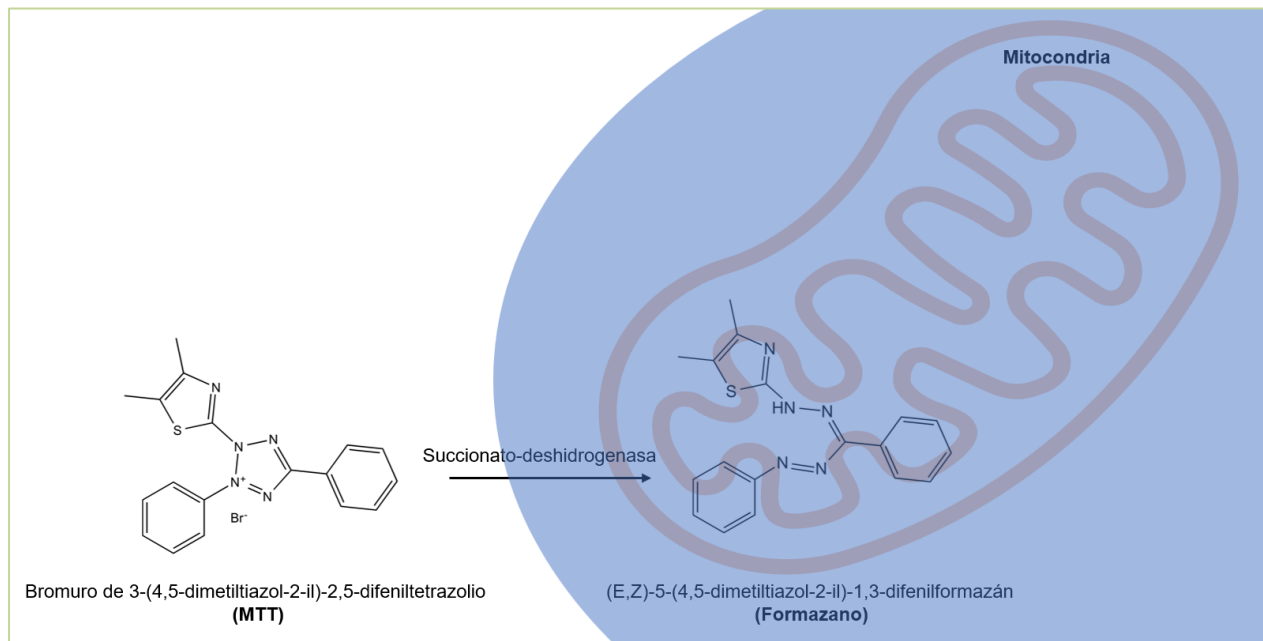


Figura 8. Conversión enzimática en la mitocondria de la célula. Modificado de [65].

Después de los cinco días de estimulación, se retiró el medio de cultivo por inversión, y se agregaron 200 μL de HBSS a cada pozo, esto sirvió como un enjuague y se dejó por aproximadamente 2 minutos. Pasado el tiempo se retiró de la misma manera que se retiró el medio, pero esta vez teniendo la seguridad de que los pozos estuvieran lo más secos posibles, se agregaron 100 μL de una solución de MTT (1 mg/mL) en HBSS en cada pozo y se dejó incubando 15 minutos, posteriormente se retiró nuevamente el contenido de los pozos y se agregaron 100 μL por pozo de una solución reveladora (30 mL de isopropanol y 14 μL de ácido clorhídrico concentrado), se dejó en el oscilador por 3 minutos o hasta que todo el color este en solución, posteriormente se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 590 nm rango visible (figura 9).

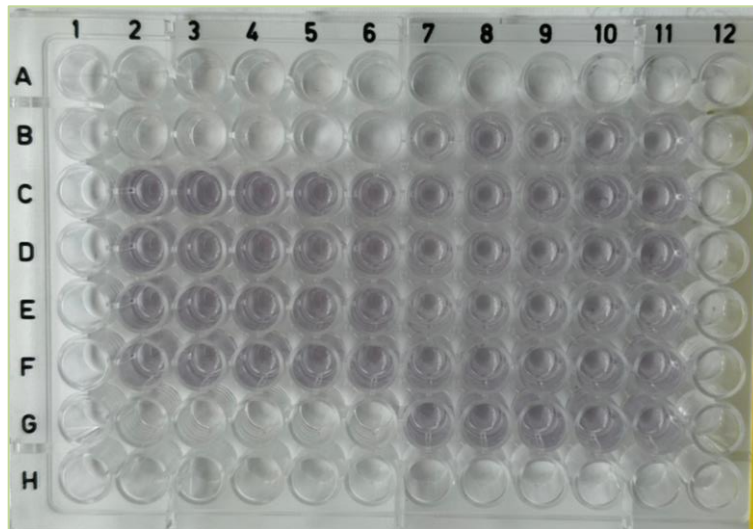


Figura 9. Técnica de viabilidad MTT en células 4T1.

- Cristal violeta (CV)

La técnica de CV en cultivo celular puede servir para determinar las diferencias en la proliferación tras la estimulación con agentes que inducen la muerte, está también puede detectar la adherencia mantenida de las células la cual interactúa con las proteínas y el ADN. Por lo tanto, las células que sufren muerte celular pierden su adherencia y posteriormente en proceso de tinción se pierden esta población de células, reduciendo la cantidad de tinción que puede ser cuantificado a una longitud de onda de 570nm [66].

Posterior a la realización del MTT, se retiró la solución reveladora y se agregaron 100 μ L de colorante CV, se dejó actuar por 2 minutos, luego se recuperó el CV procurando no tocar el fondo del pozo con las puntas de la micropipeta y se realizaron lavados con 200 μ L de agua bidestilada hasta que el agua salió sin color, luego de eso se secó muy bien y se añadió 100 μ L de otra solución de revelado (ácido acético al 10 %), se dejó en el oscilador por 3 minutos o hasta que todo el color este en solución, posteriormente se determina la densidad óptica en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 570 nm rango visible (figura 10).

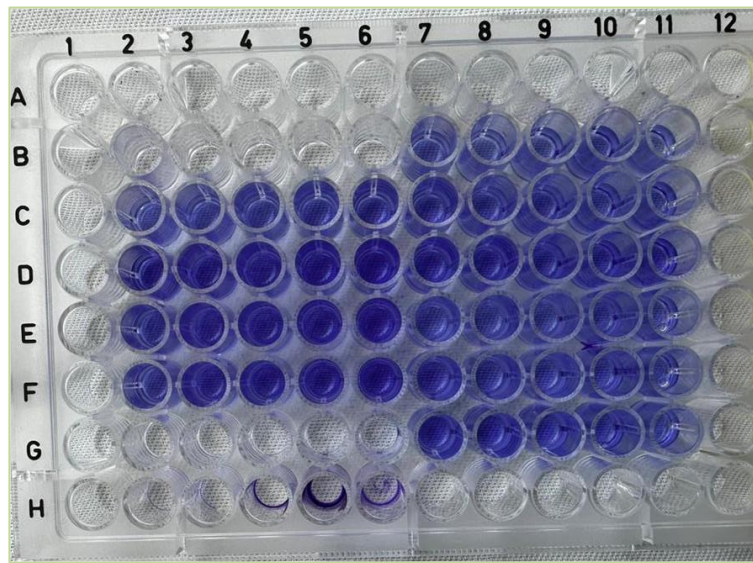


Figura 10. Técnica de viabilidad CV en células 4T1.

6.4 GRÁFICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se presentan como media \pm SEM, también se realizó el análisis de los datos con una prueba ANOVA de una vía y Turkey's para evaluar la diferencia entre los grupos considerando un valor $p < 0.05$. Las CI_{50} se obtuvieron mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %. Se usó el software GraphPad Prism 8.0.1.

7. RESULTADOS

7.1 CURVAS DE CONCENTRACIONES Y CÁLCULOS DE LAS CI_{50}

Doxorrubicina

Se utilizó doxorrubicina como control positivo, debido a que las células que utilizamos como modelos (4T1) son sensibles a este fármaco el cuál se utiliza ampliamente en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Se observó que DOXO presenta efecto anti proliferativo (figura 11) dependiente de la concentración tanto en células tumorales (4T1) como en las células no tumorales (C2C12). Esta puede ser una de las razones por las que el tratamiento de quimioterapias con este fármaco provoca múltiples efectos adversos. Se puede observar que hay una disminución en la proliferación que es estadísticamente significativo a 0.00001, 0.1, 1 y 10 μM para las células 4T1 y en las células C2C12 a partir de 0.0001 μM .

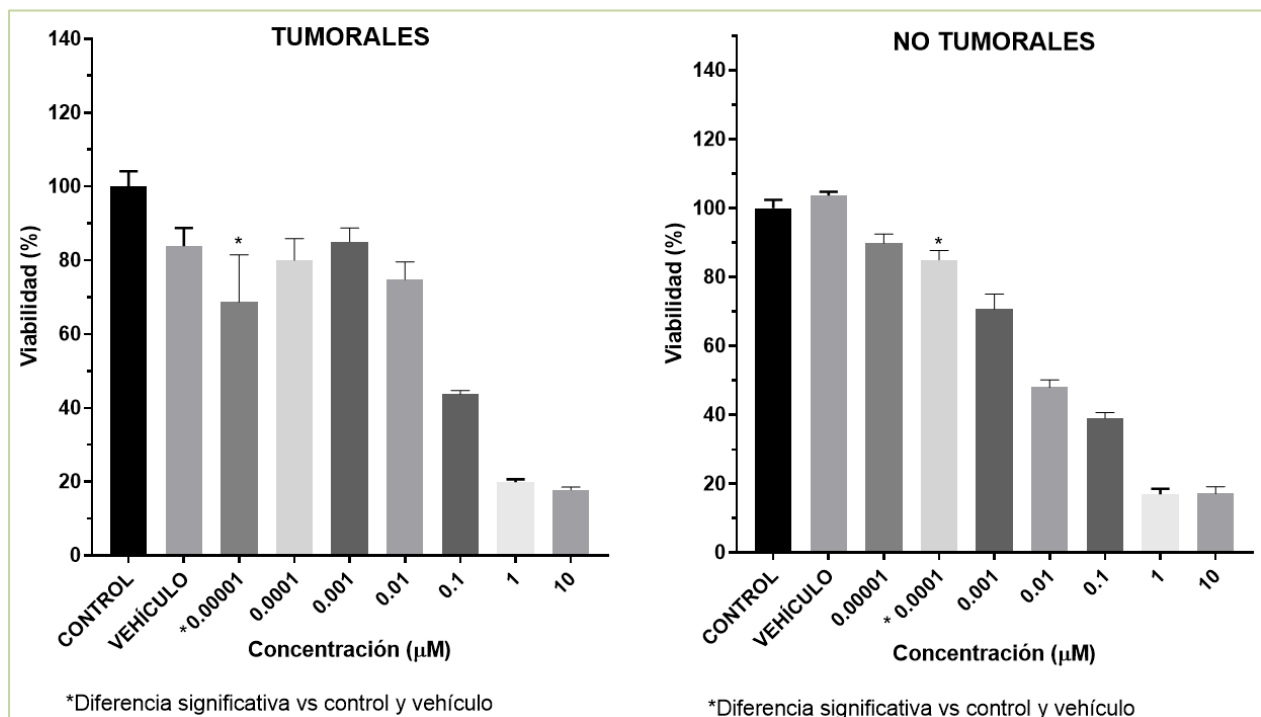


Figura 11. Efecto citotóxico del fármaco DOXO en células 4T1 y C2C12 por método de MTT. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$

La CI_{50} calculada de DOXO para las células tumorales fue de $0.0237 \mu\text{M}$, mientras que para las células no tumorales fue de $0.011 \mu\text{M}$ (figura 12), lo que indica que este medicamento no tiene selectividad al atacar las células cancerosas, ya que inhibió a los dos tipos de células por igual.

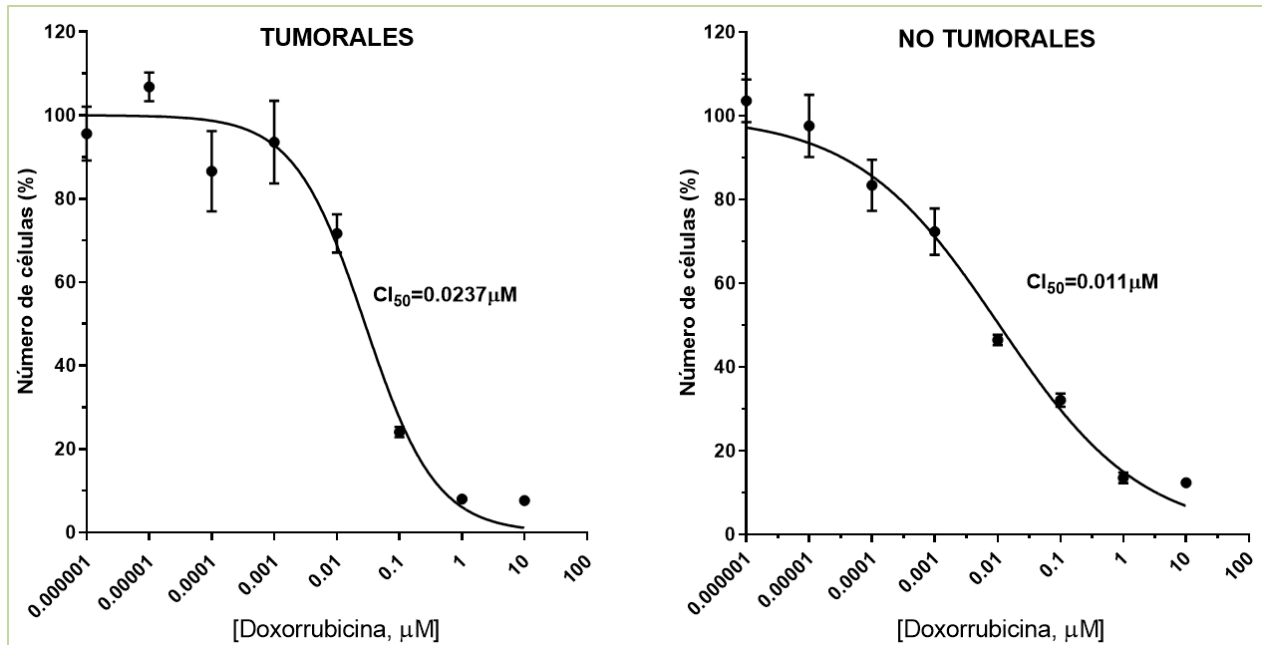


Figura 12. % de número de células de 4T1 y C2C12 por método de cristal violeta. Las CI_{50} de DOXO fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %.

Ácido bórico (A1)

Con el ácido bórico no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control-vehículo los cuales fueron comparados con los grupos de las concentraciones probadas en ambas líneas celulares, la estadística mostró que no hay ningún efecto inhibitorio significativo en las células tumorales ni en las células no tumorales (figura 13).

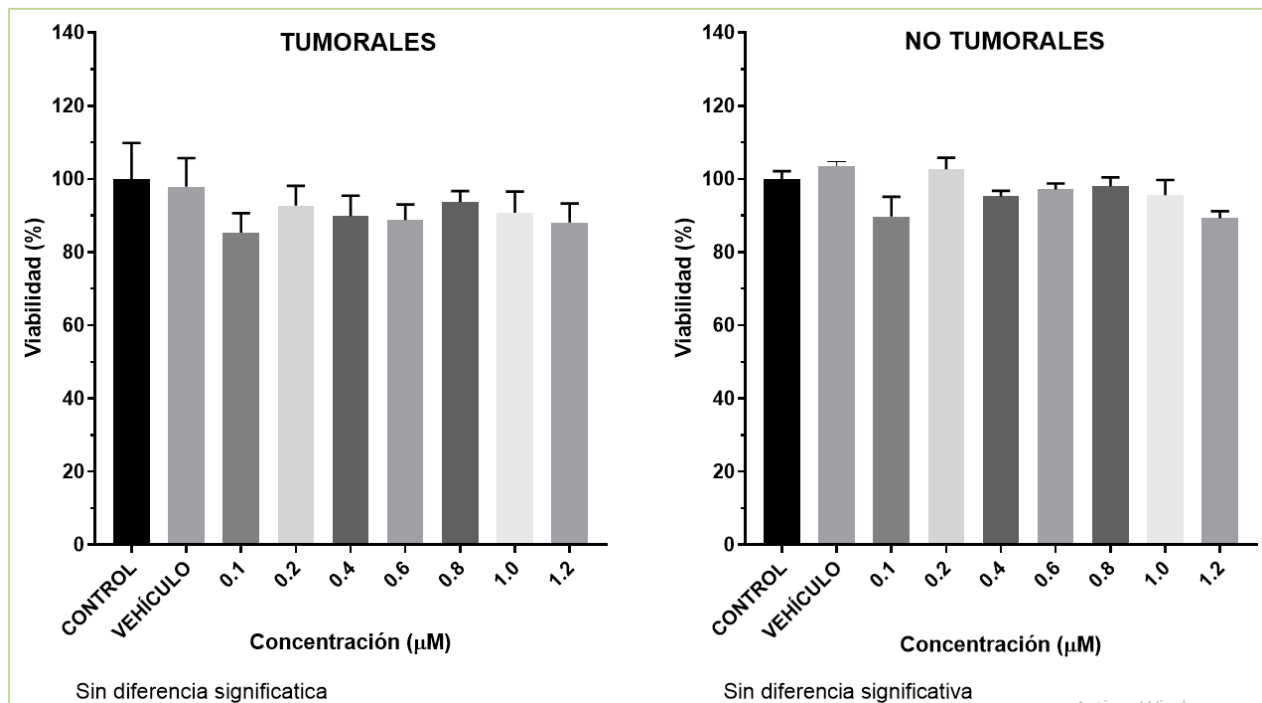


Figura 13. Efecto citotóxico del compuesto A1 en células 4T1 y C2C12 por método de MTT. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.

El ensayo de cristal violeta en células de cáncer de mama triple negativo mostró una población celular de 85 % a 95 % y en las células C2C12 mostró una población mayor, por lo que el compuesto A1 no parece tener efecto en la inhibición del crecimiento de ninguna de las dos líneas celulares (figura 14). Y dado que a las concentraciones probadas el porcentaje de células es muy elevado y no refleja una curva de concentración-respuesta adecuada, la CI_{50} para este compuesto no se puede obtener. Sin embargo, este compuesto si reporta inhibición en otras líneas cancerígenas y a concentraciones milimolares.

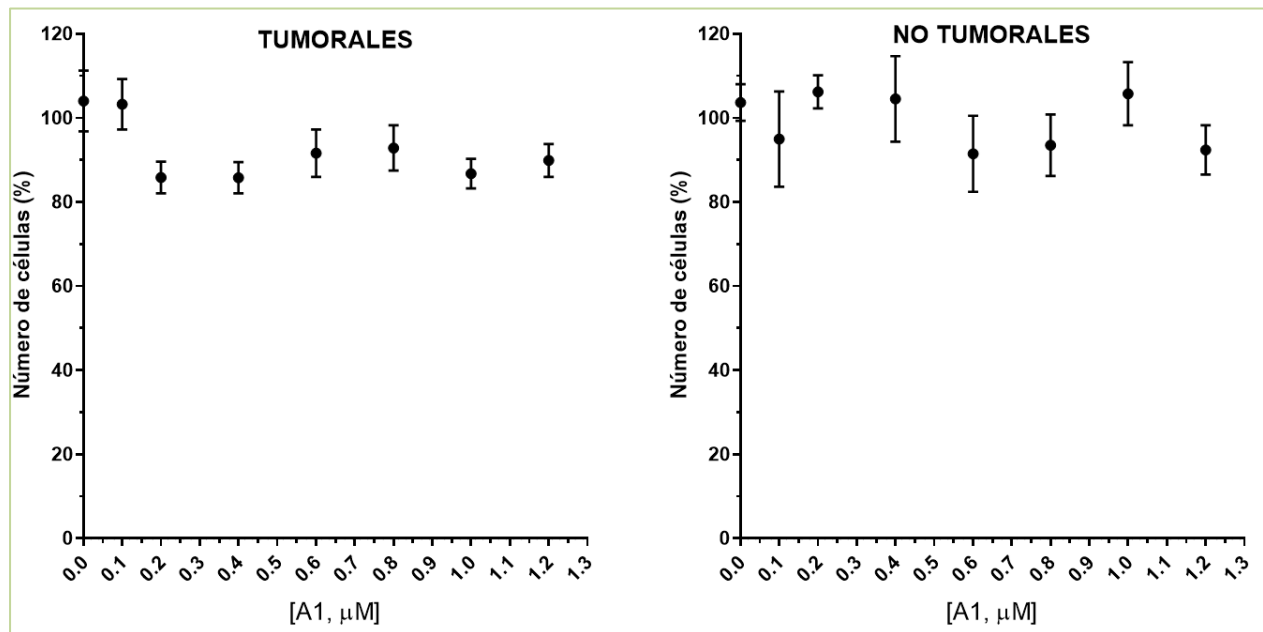


Figura 14. % de número de células de 4T1 y C2C12 del compuesto A1

Ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37)

En el ensayo de MTT el ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico presentó efectos citotóxicos e inhibitorios concentración-dependientes, los grupos de las concentraciones probadas muestran una diferencia estadísticamente significativa vs control y vehículo, en células 4T1 esta diferencia se presenta en todas las concentraciones, mientras que en las células C2C12 se presenta a partir de la concentración 0.3 μM (figura 15).

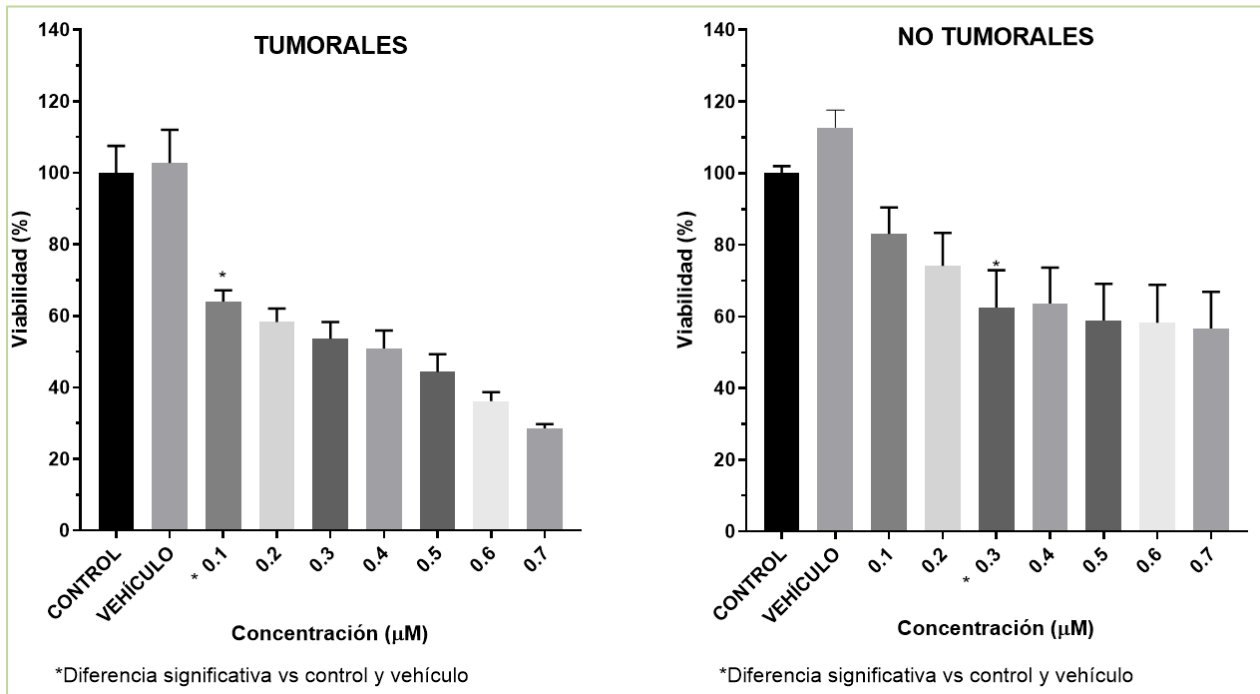


Figura 15. Efecto citotóxico del compuesto A37 en células 4T1 y C2C12 por método de MTT. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.

La inhibición del crecimiento celular con el compuesto A37 mostró un efecto significativo tanto en células cancerosas inhibiendo la proliferación un 35 % en su concentración más baja y más del 70 % en su concentración más alta y en células no cancerosas inhibiendo la proliferación entre un 18 a 44 %. La CI_{50} es dependiente de la línea celular ya que en 4T1 es de 0.1969 µM y en C2C12 a las concentraciones probadas no inhibe el 50 % de las células, pero con los datos se realizó un análisis dando como resultado un CI_{50} de 0.645 µM (figura 16).

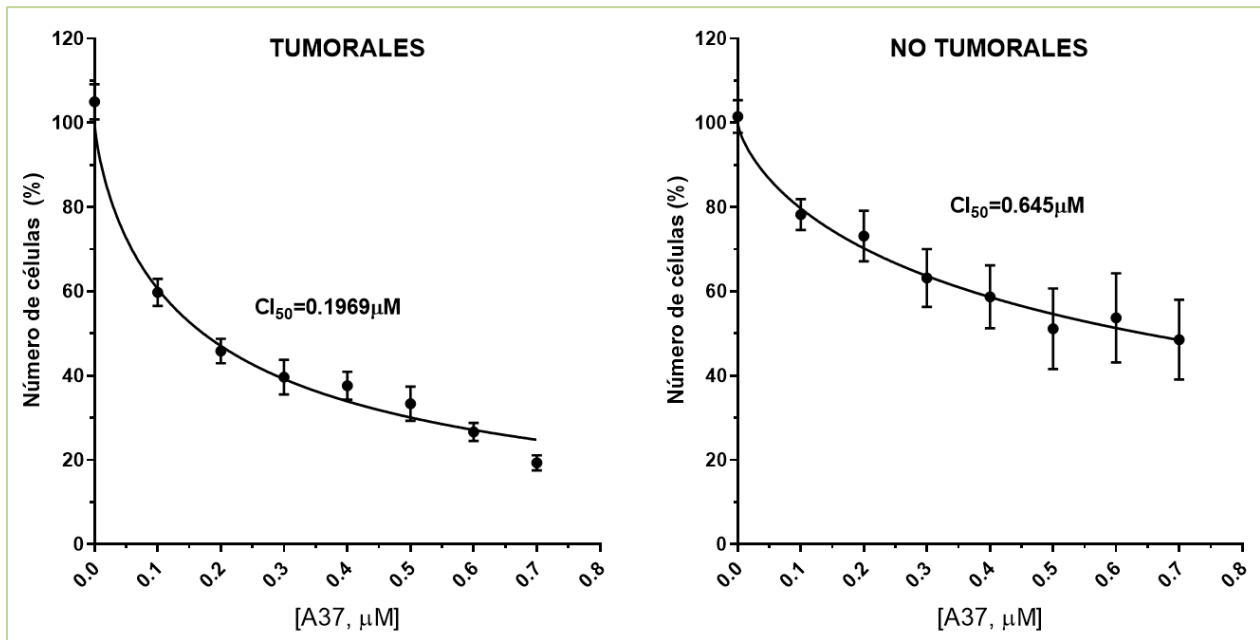


Figura 16. % de número de células de 4T1 y C2C12 por método de cristal violeta. Las CI₅₀ de A37 fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %.

Este compuesto, además de si presentar efecto citotóxico, también presenta selectividad a la inhibición de células tumorales, dado que la diferencias de CI₅₀ de una línea celular a otra es apreciable, la CI₅₀ de la línea tumoral es más del 3.5 veces menor a la CI₅₀ de la línea no tumoral.

Ácido fenantren-9-il borónico

El control con el vehículo del compuesto A46 no mostraron estadísticamente una diferencia significativa, por lo que se puede atribuir el efecto citotóxico presentado exclusivamente al compuesto.

El ácido fenantren-9-il borónico presentó el mejor efecto citotóxico en las células tumorales (figura 17), desde la concentración de 0.2 μM en adelante existe una diferencia estadísticamente significativa en dichas células, así mismo en esta concentración se inhibe el 25 % del crecimiento, con 0.3 μM se inhibe el 50 % y con el 0.4 μM se inhibe el 75 % y en a las concentraciones de 0.5, 0.6 y 0.7 μM se alcanza y se mantiene su mayor efecto citotóxico, que es del 80-82 %.

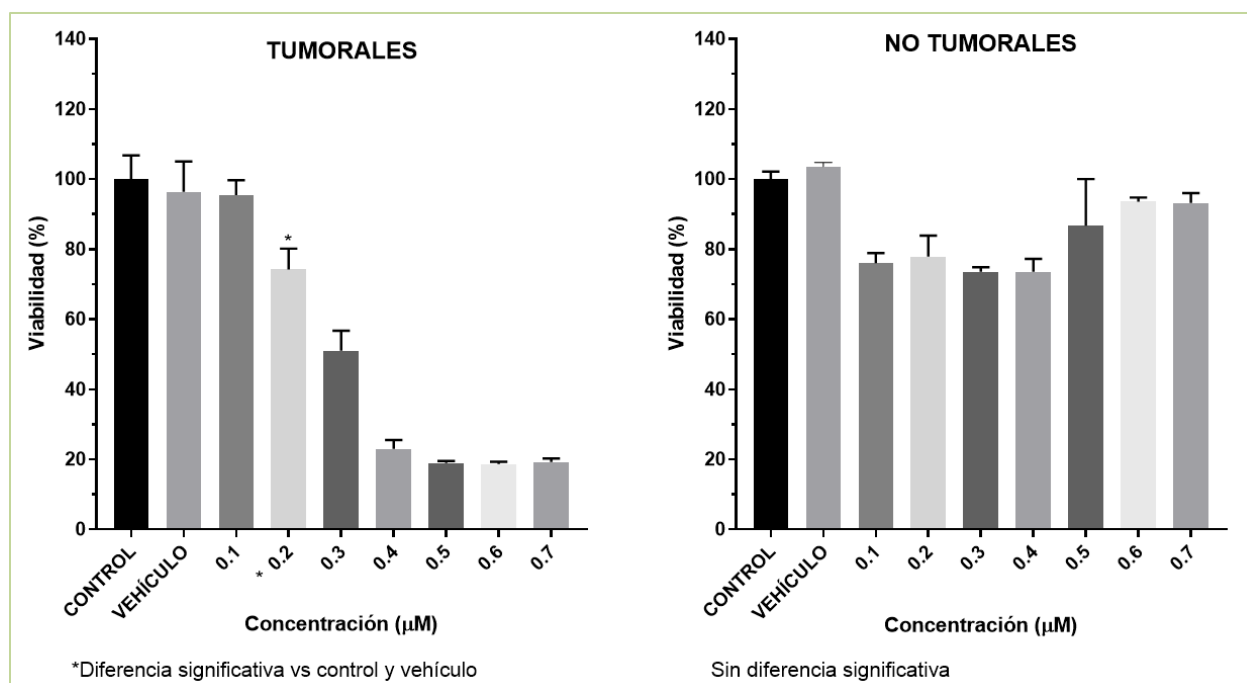


Figura 17. Efecto citotóxico del compuesto A46 en células 4T1 y C2C12 por método de MTT. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.

Este compuesto también presentó una selectividad al solo inhibir el crecimiento de las células tumorales, ya que solo presentó un efecto citotóxico de 25 % en las células no tumorales, además que en las concentraciones más altas probadas no se inhibe ni un 15 %. Con los datos obtenidos del ensayo de cristal violeta se obtuvo una gráfica la cual indica que el compuesto A46 tiene una CI_{50} de 0.2251 μ M para las células tumorales y como para las células no tumorales no se aprecia una buena respuesta citotóxica concentración-dependiente, no se pudo obtener CI_{50} de este compuesto para estas células (figura 18).

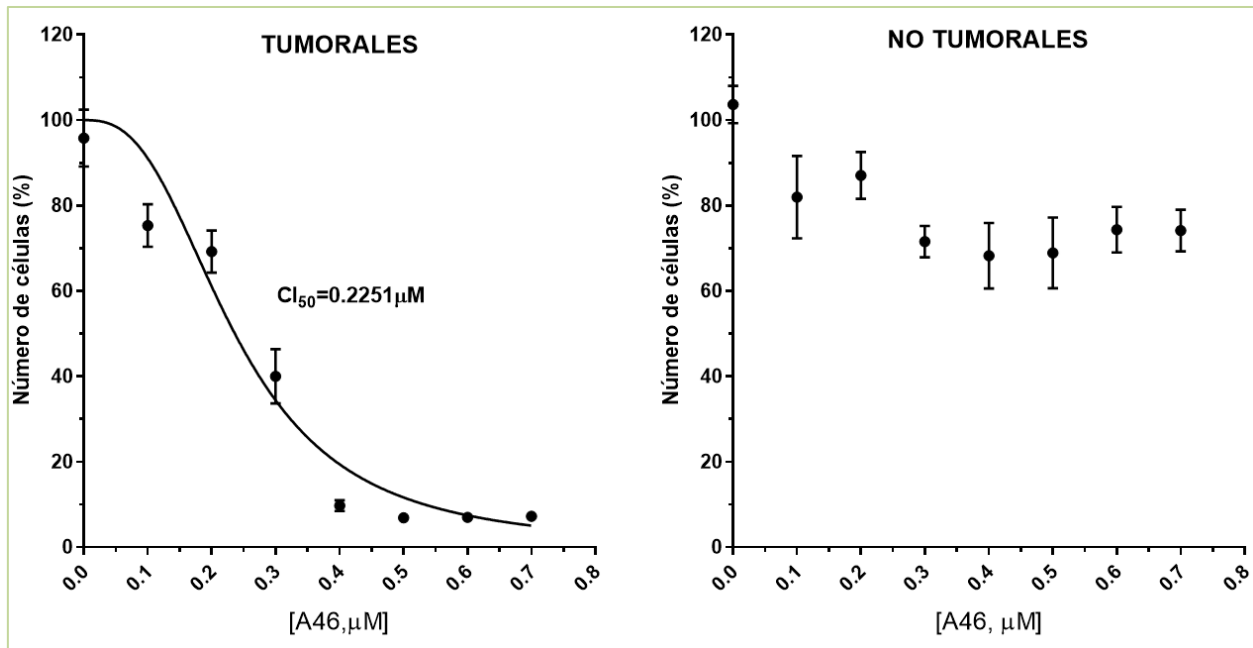


Figura 18. % de número de células de 4T1 y C2C12 por método de cristal violeta. Las CI_{50} de A46 fueron obtenidos mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %.

Ácido 9H-fluoren-2-il borónico

Para este compuesto el grupo control y vehículo no presentó diferencia estadísticamente significativa y estos grupos tampoco presentaron esa diferencia con los grupos de las concentraciones probadas (figura 19). Se pudo observar que a las concentraciones reportadas en la tabla 4, solo se alcanzó una disminución del 26 % el crecimiento celular tumoral, por lo que se decidió probar 4 concentraciones más altas (150, 200, 250 y 300 μ M) esperando que se presentara un mayor efecto citotóxico, sin embargo, eso no ocurrió.

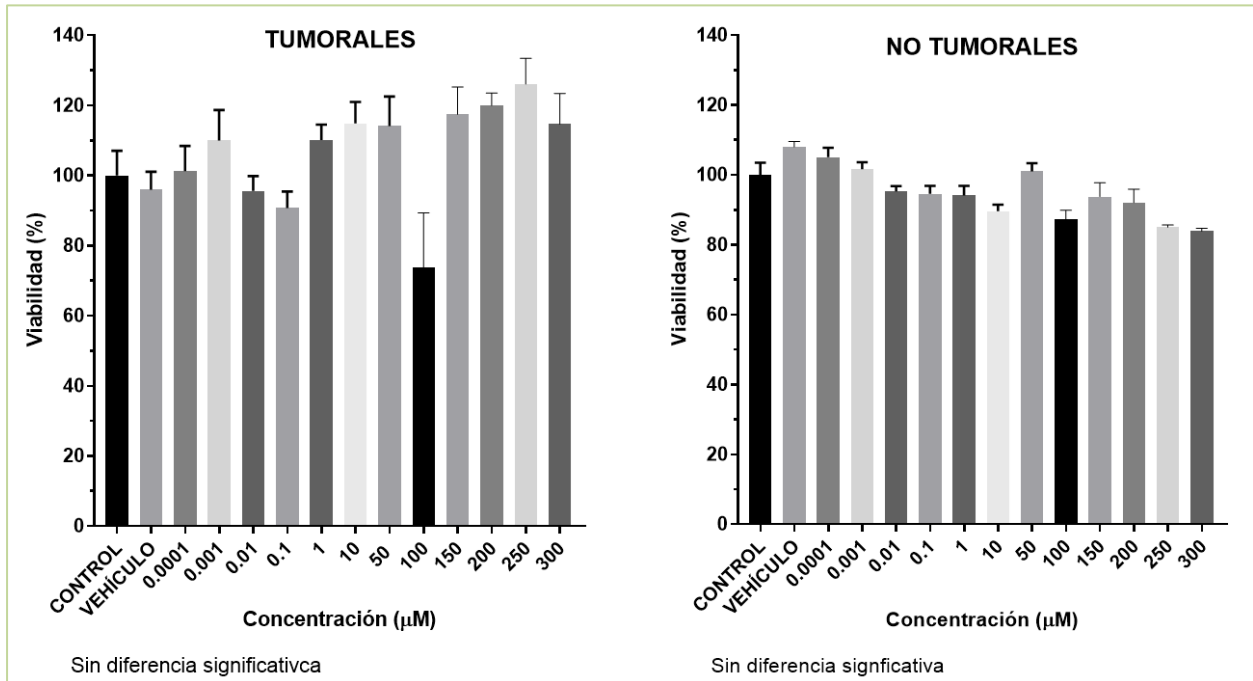


Figura 19. Efecto citotóxico del compuesto A57 en células 4T1 y C2C12 por método de MTT. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL y VEHÍCULO. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$.

Al no presentarse un buen comportamiento concentración-dependiente del compuesto A57 no se puede realizar la regresión no lineal [inhibidor] vs respuesta normalizada. El máximo efecto alcanzado en la línea celular tumoral fue de 26 % y del 17 % en la línea celular no tumoral (figura 20).

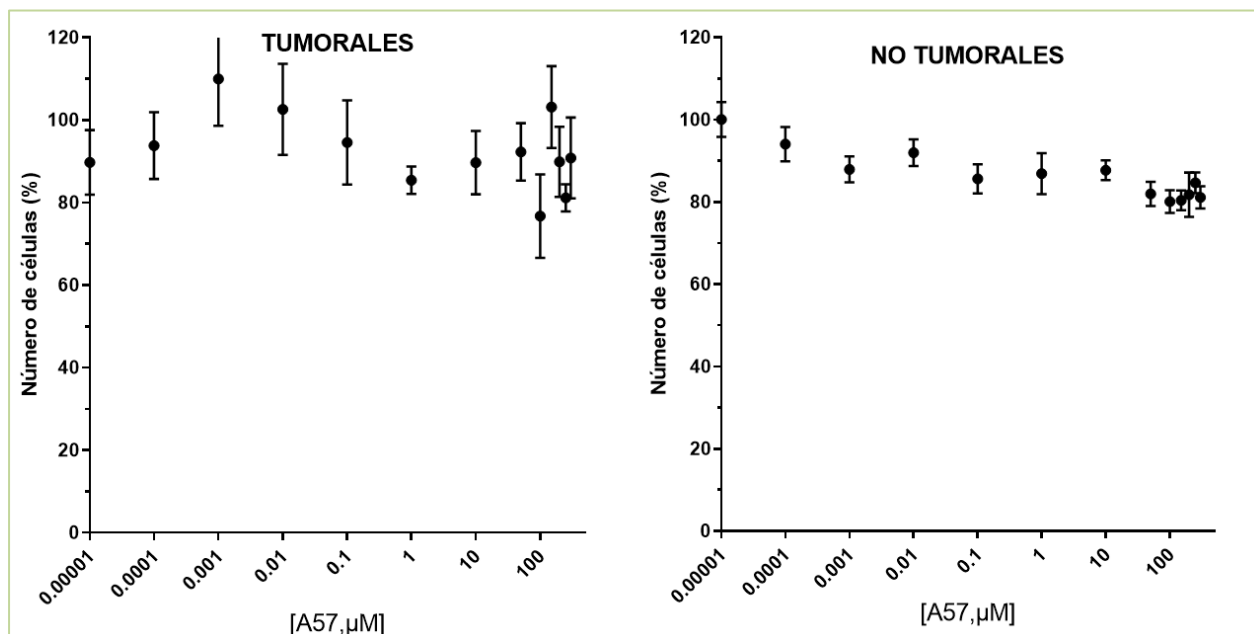


Figura 20. % de número de células de 4T1 y C2C12 por método de cristal violeta. Las CI_{50} de A57 no se pudieron obtener mediante una regresión no lineal de [inhibidor] frente a la respuesta normalizada con un nivel de confianza del 95 %.

7.2 COMPARACIÓN DE LAS CI_{50}

El control positivo (DOXO) presenta una CI_{50} más baja que los compuestos probados, de los cuales solo dos de los cuatro tuvieron una buena respuesta a la inhibición de células tumorales concentración-dependiente por lo que fue posible realizar una curva de concentración-efecto y así obtener sus CI_{50} (figura 21). Por otro lado, DOXO también presentó efecto en las células no tumorales, caso contrario con el compuesto A46, el cual tuvo un menor efecto citotóxico en las células no tumorales y A37, aunque también presentó un CI_{50} en células no tumorales este fue mucho mayor que el CI_{50} en células tumorales.

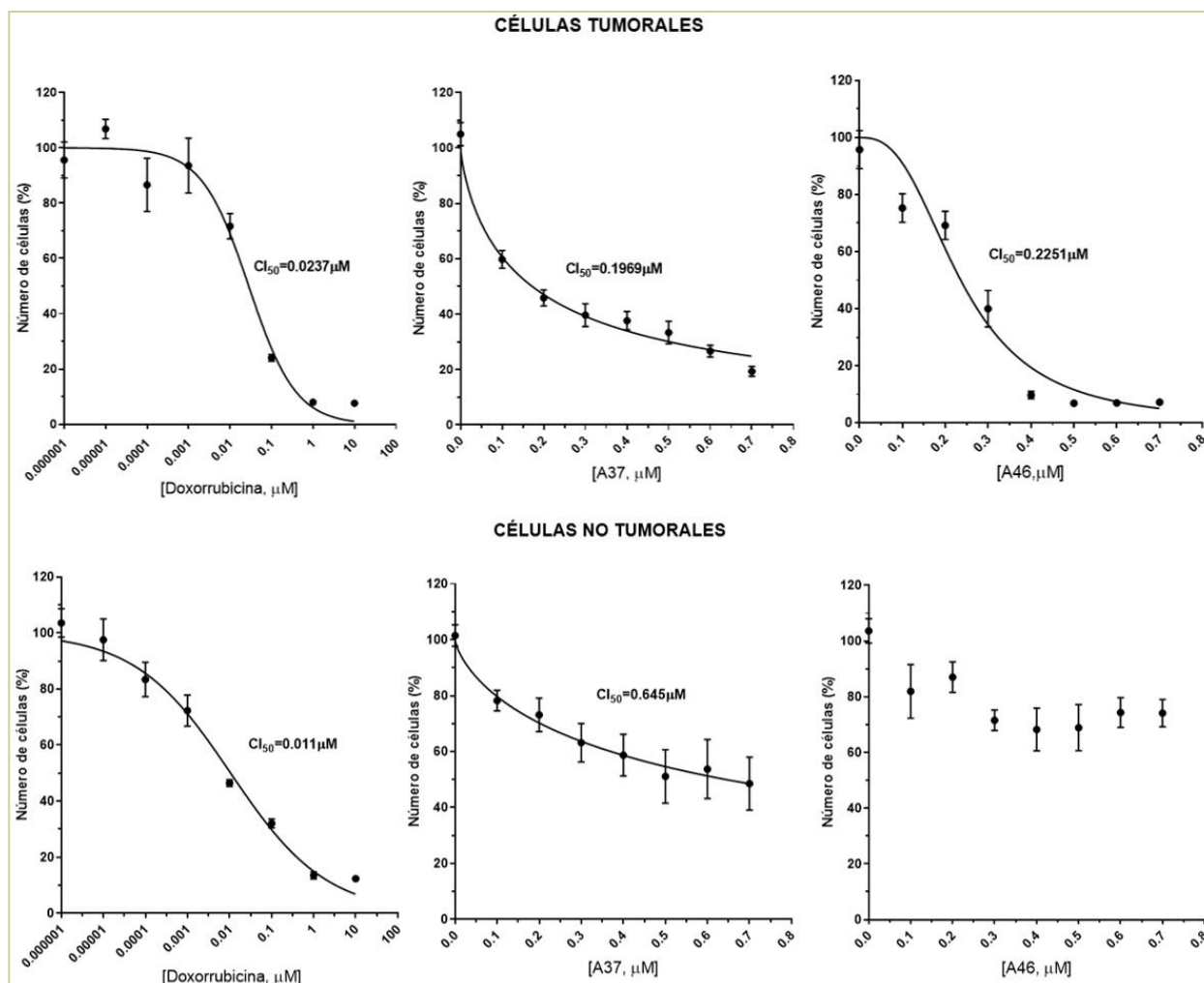


Figura 21. Comparación de las CI50 obtenidos en ambas líneas celulares.

Con los datos obtenidos de las regresiones no lineales por el programa de GraphPad Prism 8.0.1 se obtuvieron las CI₂₀ – CI₈₀ de los cuatro compuestos borados y doxorubicina, las cuáles se reportan en la tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones inhibitorias de los compuestos probados en células tumorales

CONCENTRACIONES INHIBITORIAS (μM) EN CÉLULAS 4T1							
	CI20	CI30	CI40	CI50	CI60	CI70	CI80
DOXO	0.0016	0.0038	0.0092	0.0237	0.0536	0.1293	0.3117
A37	0.0525	0.0818	0.1273	0.1969	0.3084	0.4800	0.7472
A46	0.1183	0.1455	0.1790	0.2251	0.2710	0.3333	0.4101

7.3 ANÁLISIS DE LOS ENSAYOS DE INTERACCIÓN FARMACOLÓGICA

Solo el ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico y el ácido fenantren-9-il borónico mostraron un efecto inhibitorio en las células 4T1, los ensayos de interacción farmacológica solo se realizaron utilizando estos dos compuestos y se descartó el ácido bórico y el ácido 9H-fluoren-2-il borónico.

Con Cl₄₀, Cl₂₀ y Cl₁₀ se observó que DOXO y los compuestos si mostraron efecto por separados, pero al realizar las combinaciones de los compuestos con DOXO, no se observa el efecto deseado o esperado (figura 22), ya que se percibe un efecto muy similar al de DOXO. También se observa que en el caso de las Cl₂₀ y Cl₁₀ todos los grupos son significativamente diferentes con el control, pero los grupos DOXO, A37 y A46 no lo son con respecto al grupo de la combinación.

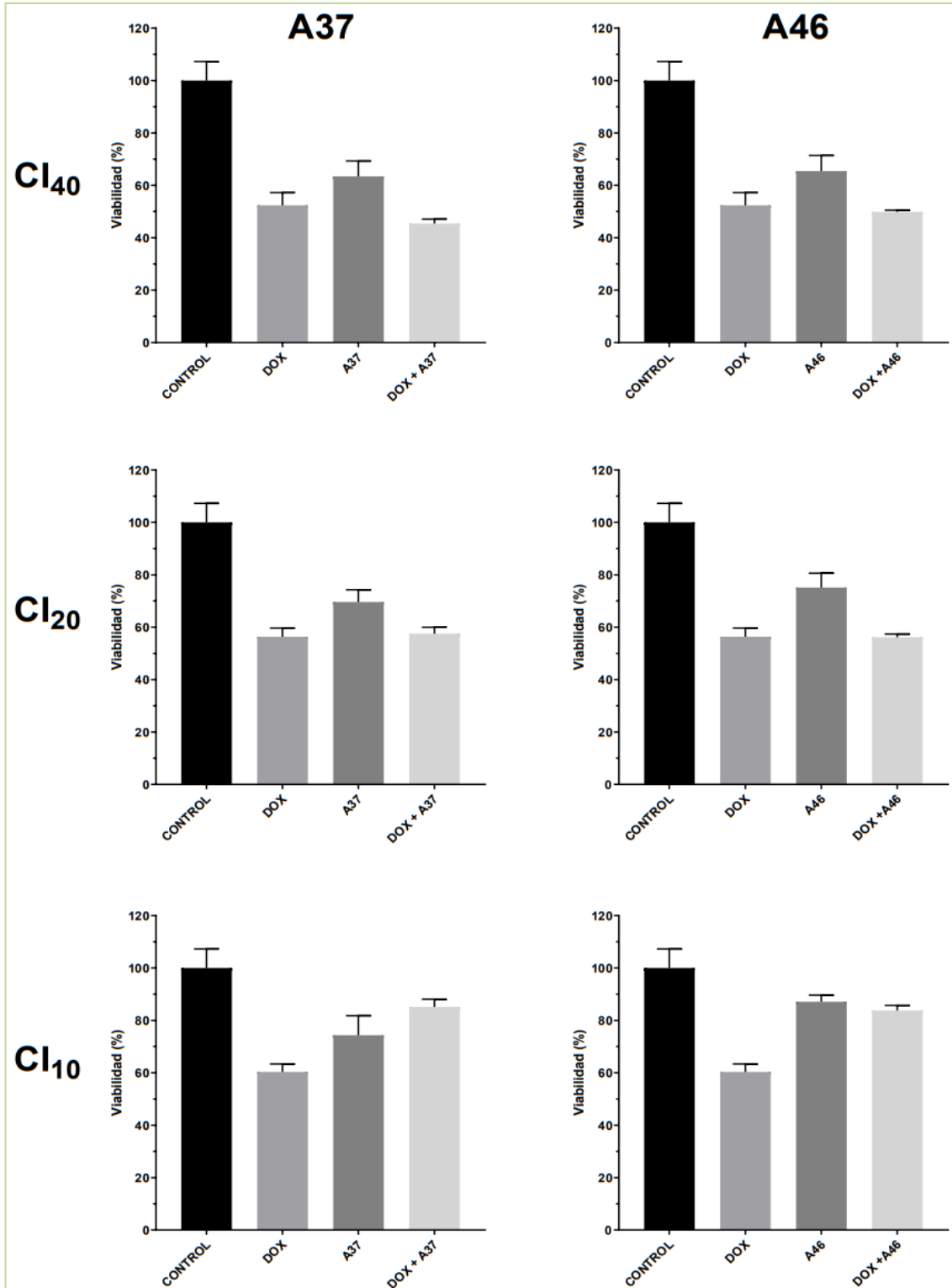


Figura 22. Efecto citotóxico de los compuesto A37, A46, DOX y sus combinaciones en células 4T1. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$

Ya que con la Cl₄₀ no se observó este efecto se decidió probar una concentración menor (figura 23), por lo que también se realizaron experimentos con la Cl₃₅, desafortunadamente tampoco se observó un efecto de sinergismo de los compuestos con DOXO, se mantuvo el mismo comportamiento que con la Cl₄₀. Al graficar los grupos con Cl₃₅ por separado se observa que todos los grupos son significativamente diferentes con el control, pero los grupos DOXO, A46 y A37 no lo son con el grupo de la combinación, esto también pasa para la Cl₁₈ y Cl₉ del mismo compuesto y del compuesto A37.

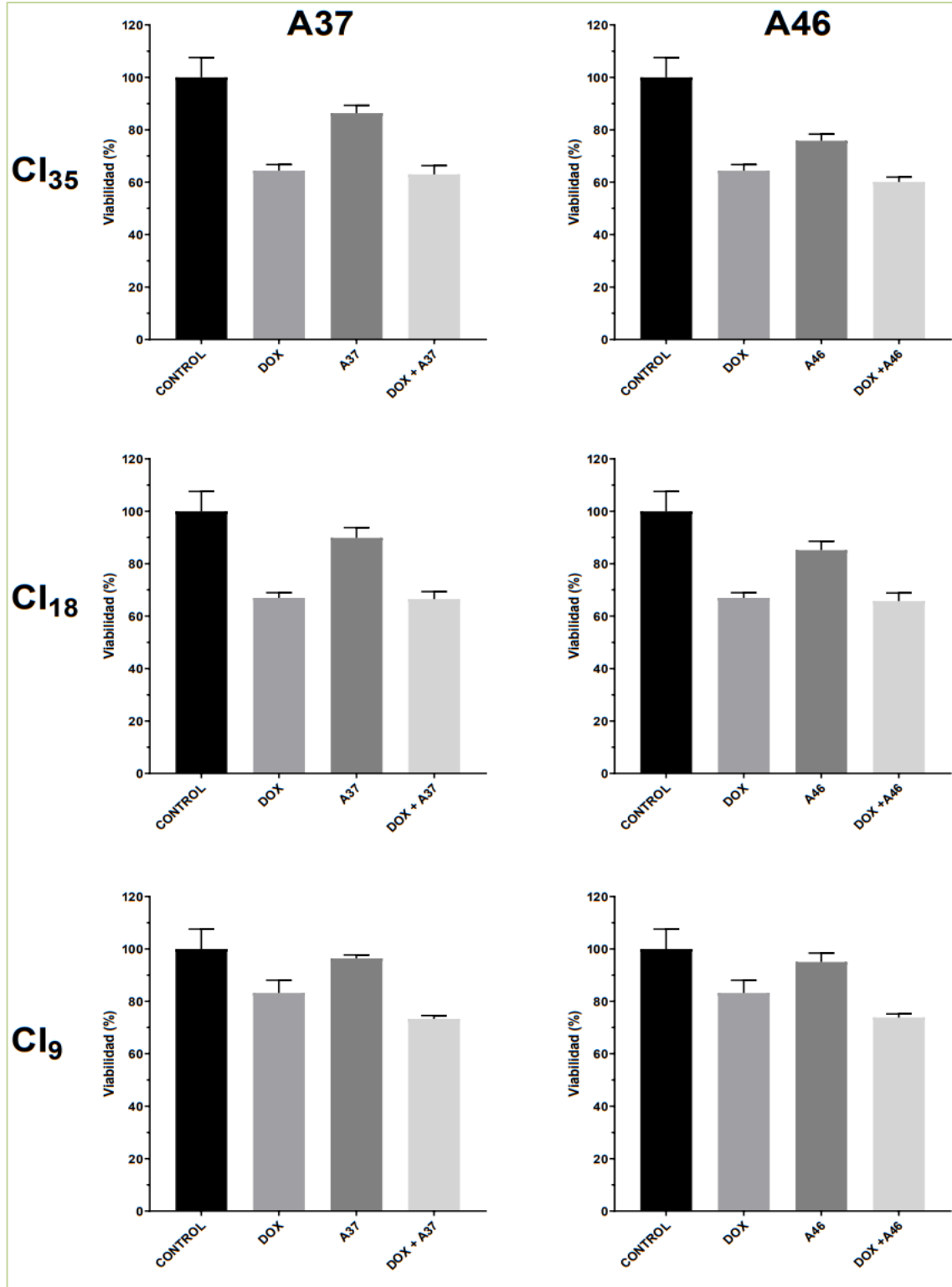


Figura 23. Efecto citotóxico de los compuesto A37, A46, DOX y sus combinaciones en células 4T1. Todos los grupos se compararon con su correspondiente CONTROL. Los resultados se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía y Turkey's con un $*P < 0,05$

8. DISCUSIÓN

En otros ensayos reportados con DOXO en células 4T1 como cancerosas y una línea celular VERO 76 (riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) como células no cancerígenas, se reportaron unas CI_{50} de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 0.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, que equivalen a 0.919 μM en las células 4T1 y 0.368 μM en las células VERO [67]. También se reporta una CI_{50} de 0.39 μM para células 4T1 y 2.65 μM para una línea celular de cáncer de mama humano (T47D) [68]. Con esto se puede decir que doxorubicina es un fármaco que, aunque es utilizado para diversos tipos de cáncer, no es porque sea selectivo al atacar células cancerígenas, si no que ataca a muchos tipos de células y en algunos casos las células no tumorales parecen más susceptibles a los efectos citotóxicos de doxorubicina.

En diversos artículos se reportan efectos citotóxicos de A1 en otro tipo de células, entre los cuales reportan una CI_{50} de 1000 $\mu\text{g/mL}$ que equivale a 16.13 mM para una línea de cáncer de pulmón de células pequeñas, así mismo se reportó una CI_{50} de 5500 $\mu\text{g/mL}$ que equivale a 88.76 mM para una línea celular no cancerosa (MCR-5) [41]. Como se puede observar en la figura 13, las concentraciones probadas en estos ensayos son exageradamente menores que los reportados en el artículo, además de eso se utilizó una línea celular tumoral diferente, tales motivos son la razón por las que los efectos citotóxicos del ácido bórico no se presentaron en estos experimentos.

Los compuestos A37 y A46 además de presentar efecto anti proliferativo concentración-dependiente en células tumorales, también presentaron selectividad hacia dichas células, ya que, A37 en su concentración más alta inhibe el 80 % de células tumorales y casi el 50 % de células no tumorales y A46, inhibe hasta un 90 % de las células tumorales mientras que en células no tumorales solo se inhibe el 20 %. Y aunque A46 presenta una CI_{50} más alto que el de A37, presenta una mejor selectividad a la inhibición de células tumorales, por lo que este compuesto es un buen candidato para continuar con estudios preclínicos y clínicos. Para estos compuestos no se reportan datos de algún tipo de efecto farmacológico que pudieran tener, sin embargo, hay artículos que reportan que diversas moléculas derivadas de naftaleno y fenantreno

poseen efectos citotóxicos en células cancerígenas [69, 70]. Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que los compuestos A37 y A46 tienen un buen efecto al inhibir el crecimiento de células de cáncer de mama triple negativo murino, además de poseer una selectividad hacia las células tumorales, cosa que doxorubicina no presenta. Aunque el CI_{50} de A37 es menor que el de A46, este último presentó mayor selectividad hacia las células deseadas, esto es relevante ya que, tener compuestos que van más dirigidos a tratar la enfermedad puede ayudar a disminuir la toxicidad y diversos efectos adversos antes mencionados que provoca la quimioterapia hacia este tipo de cáncer.

El compuesto A57 muestra un ligero efecto inhibitorio de proliferación, por lo que se puede sugerir hacer otro estudio incrementando las concentraciones. Los compuestos A37, A46 y A57 tienen un grupo en común en su estructura, $B(OH)_2$, que es el ácido borónico, este mismo grupo se encuentra en las estructuras de los compuestos probados en Cebecchi y *et al.* en 2022, los cuales, al igual que A37 y A46 mostraron tener efecto citotóxico al inhibir el crecimiento de una línea celular DMS-114 (cáncer de pulmón de células pequeñas), ya que, NaB reporta una CI_{50} de 1250 $\mu\text{g/mL}$ y SPT una CI_{50} de 15 $\mu\text{g/mL}$. Teniendo un mayor efecto a las concentraciones más altas utilizadas (4000 $\mu\text{g/mL}$) y al tiempo de exposición más alto (72 horas) para ambos compuestos. El ácido bórico tuvo una viabilidad celular de al menos del 50% en 24, 48 y 72 horas de exposición y el pentaborato de sodio pentahidratado mantuvo una viabilidad de menos del 50% con 72 horas de exposición, pero con 24 y 48 horas obtuvo una viabilidad entre 60-70% [41].

Aunque estos compuestos no fueron probados en este trabajo, también tienen efecto citotóxico, sin embargo, no se le puede atribuir el efecto solo por ser un compuesto borado, ya que de los cuatro compuestos probados solo el A37 y A46 probaron tener el efecto inhibitorio de la proliferación, con lo cual se puede inferir que el resto de la estructura de la molécula influye de manera importante a la actividad citotóxica de los compuestos hacia las células de cáncer. Así mismo, los datos obtenidos sugieren que se pueden hacer más experimentos para los compuestos A37 y A46, tal vez en un

modelo animal para ver los efectos de estos compuestos, como el tamaño de tumores, tiempo de vida del animal, etc.

De los ensayos de interacción, no se obtuvieron los resultados esperados, ya que no se observó un efecto de sinergia, ni de aditividad al combinar los compuestos borados con DOXO, en las gráficas solo se puede observar que el efecto de la combinación, casi en todos los casos era un efecto muy similar al que presentaba DOXO. Para este trabajo solo se realizaron ensayos a concentraciones 1:1, sin embargo, cabe mencionar que este tipo de ensayos pueden hacerse a relaciones diferentes, como lo puede ser 1:2 y 1:4 que son las más comunes.

9. CONCLUSIONES.

- Solo dos de los cuatro compuestos probados inhiben la proliferación de células 4T1, siendo el ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico (A37) y ácido fenantren-9-il borónico (A46) los que presentaron este efecto. Y el ácido bórico (A1) y ácido 9H-fluoren-2-il borónico (A57) no tiene efecto anti proliferativo.
- El ácido fenantren-9-il borónico presentó una CI_{50} de 0.2251 μM , esta concentración es 9.5 veces mayor a la CI_{50} del control positivo DOXO que fue de 0.0237 μM . Sin embargo, este compuesto borado tiene la mejor selectividad hacia las células tumorales ya que a las mismas concentraciones probadas en las células 4T1 solo disminuyó la viabilidad en un 25 %.
- El ácido (6-hidroxineftalen-2-il) borónico presentó una CI_{50} de 0.1969 μM , esta concentración es 8.3 veces mayor a la CI_{50} de DOXO, pero es menor que la CI_{50} presentada por A46. Sin embargo, A37 tiene una selectividad menor a las células tumorales que A46, ya que a las mismas concentraciones muestra una selectividad de solo 3 veces mayor a dichas células que a las no tumorales.
- Las interacciones farmacológicas no mostraron un comportamiento de aditividad o de sinergia de los compuestos A37 y A46 con DOXO, no se realizaron experimentos con los compuestos A1 y A57 ya que no se demostró la existencia de un efecto anti proliferativo.

10.- REFERENCIAS.

1. López ME, Salamanca GF. Cáncer de mama. Rev Med Inst Mex Seg Soc. [Internet]. 2020. [Consultado el 05 enero 2023]; 58 (1): 1-3. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/4577/457769373001/html/>
2. Palmero PJ, Lassard RJ, Juárez ALA, Medina NCA. Cáncer de mama: una visión general. Acta Med Grupo Ángeles. [Internet]. 2021. [Consultado 05 enero 2023]; 19 (3): 354-360. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.35366/101727>
3. cancer.org. The History of cancer. American Cancer Society; [sin fecha de actualización]. Disponible en [https:// www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer. html](https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/history-of-cancer.html)
4. Mandell JB. Bathsheba's breast Women, cancer and history. J Clin Invest. 2005;115(6):1397
5. Barrón CA, Jave LF, Aguilar LA. Historia del cáncer de mama. Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet]. 2020. [Consultado 05 enero 2023]; 58 (1): 75-82. Disponible en Historia del cáncer de mama (redalyc.org)
6. Lukong KE. Understanding breast cancer – The long and winding road. BBA Clin. 2017; 7:6477
7. Ackerknecht EH. Historical Notes on Cancer. Med Hist. 1958;2(2):1149
8. Donegan W. History of breast cancer. In: Winchester DJ, Hudis C, Norton L, ed. Breast cancer. Hamilton, Ontario: BC Decker; 2006:114
9. Meza SLM. CÁNCER DE MAMA: EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL MANEJO DE LA AXILA Y EL ROL ACTUAL DE LA CIRUGÍA [Tesis Especialidad]. Costa Rica: Filólogos Bórea; 2020. [Internet] [Consultado 08 enero 2023]. Disponible en: <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/81389>

10. Picard JD. History of mammography. Bull Acad Natl Med. 1998; 182:161320.
11. Beatson GT. On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma: Suggestions for a New Method of Treatment, with Illustrative Cases. Trans Med Chir Soc Edinb. 1896; 15:153-79.
12. Olson JS. The History of Cancer: An Annotated Bibliography. New York: Greenwood Press; 1991:77
13. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. Nat. Rev. Drug Discov. 2003; 2:20513
14. Bolaño GLM, Rodríguez, ODL, Pérez CES, Chávarri GY. HISTORIA DE LOS RECEPTORES HORMONALES Y DE LA TERAPIA HORMONAL EN CÁNCER DE MAMA. Med. [Internet]. 2021. [Consultado 08 enero 2023]; 43 (1): 189-207. Disponible en: <https://www.revistamedicina.net/index.php/Medicina/article/view/1594>
15. ourbodiesourselves.org. History. Our Bodies Ourselves; [sin fecha de actualización]. Disponible en <https://www.ourbodiesourselves.org/our-story/history>
16. Rosenbaum J. Rose Kushner. Jewish Women: A Comprehensive Historical Encyclopedia; 27 February 2009. Disponible en <https://jwa.org/encyclopedia/article/kushner-rose>
17. The Treatment of Primary Breast Cancer: Management of Local Disease. NIH Consens Statement Online 1979;2(5):29-30
18. Mario GR. El Boro en las Ciencias Médicas [Tesis grado en Farmacia]. Fac Far Uni Cump Mad. [Internet]. 2018. [Consultado 01 febrero 2022]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/62732/>

19. Emre Cebeci, Büsra Yüksel y Fikretin Sahin. Anti-cancer effect of boron derivatives on small-cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [Internet]. 2022. [Consultado 01 febrero 2022]; 70 (1). Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/357581802>
20. Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem*. 2009. [Consultado 02 febrero 2023]; 1 (7): 1275-89.
21. Silva MP, Saraiva L, Pinto M, Sousa ME. Boronic Acids and Their Derivatives in Medicinal Chemistry: Synthesis and Biological Applications. *Molecules* [Internet]. 2020. [Consultado 03 febrero 2023]; 25 (18): 4323. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25184323>
22. Laurentia GN, Rodica AM. BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY: DELIVERY AGENTS USED IN BORON ADMINISTRATION. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology*. 2016; 20 (1): 25-32.
23. Barth RF, Mi P, Yang W. Boron delivery agents for neutron capture therapy of cancer. *Cancer Commun* [Internet]. 2018. [Consultado 04 febrero 2023]; 38 (1): 35. Disponible en: doi: 10.1186/s40880-018-0299-7. PMID: 29914561; PMCID: PMC6006782.
24. INEGI. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA. [Internet]. 2021. [Consultado 05 febrero 2023]. Disponible en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_LUCHA_CANCER2021.pdf
25. Catherine SN. KNOWING AND UNDERSTANDING THE CANCER CELL: PHYSIOPATHOLOGY OF CANCER. *Rev med clin condes* [Internet]. 2013. [Consultado 10 enero 2023]; 24 (4): 553-562. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S071686401370659X?token=F36EDFD>

A4

D6F7363E11C823340E447C535182E3CC8D8A9A97D9158B9897E1403F58856

4

728BF095A20B9D569CB223CD9&originRegion=us-

east1&originCreation=20220706204503

26. Hajdu S I. A note from history: the first tumor pathologist. *Ann Clin Lab Sci* (2004): 34, 355-356
27. Vesely M D, Kershaw M H, Schreiber R D, Smyth M J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* (2011): 29, 235-271.
28. Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer* (2012): 12, 767-775.
29. Weitzel J N, Blazer K R, Macdonald D J, Culver J O, Offit K. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA Cancer J Clin* (2011).
30. Gonzalo V, Castellví BS, Balaguer F, Pellisé M, Ocaña T y Castells A. Epigenetics of cancer. *Gastroenterología y Hepatología*. [Internet]. 2008. [Consultado 12 enero 2023]; 31 (1): 37-45. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0210570508712585?via%3Dihub>
31. Viatour P, Sage J. Newly identified aspects of tumor suppression by RB. *Dis Model Mech* (2011): 4, 581-585
32. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* (2010): 19, 1093-1102.
33. Qian B Z, Pollard J W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* (2010): 141, 39-51
34. Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* (2011): 144, 646-674.
35. López M, Anzola N, Cuevas JM, Aguirre M y Martínez M. p53, un gen supresor tumoral. *Gaceta Médica de Bilbao*. [Internet]. 2001. [Consultado 12 enero 2023];

- 98 (1): 21-27. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-medica-bilbao-316-articulo-p53-un-gen-supresor-tumoral-S0304485801743508>
36. Wong R S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res* (2011): 30, 87.
37. Park M, Kim D, Ko S, Kim A, Mo K, Yoon H. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International Journal of Molecular Sciences*. [Internet]. 2022. [Consultado 14 enero 2023]; 23 (12): 6806. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23126806>
38. Vaupel P, Multhoff. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol*. [Internet]. 2021. [Consultado 14 enero 2023]; 599 (6): 1745-1757. doi: 10.1113/JP278810.
39. Gutiérrez C.A. Propuesta para intervenir un problema de salud pública: “Cáncer de Mama en el Departamento de Santander [Diplomado de profundización para grado]. Repositorio Institucional UNAD. 2019. [Internet]. [Consultado 14 enero 2023]. Disponible en: <https://repository.unad.edu.co/handle/10596/31448>
40. Alcaide L.M, Rodríguez GCJ, Lartategui SR, Gallart A.T, Sánchez B.M.T, García R.J, Torné P.P. Clasificación actual del cáncer de mama. Implicación en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. *Cir Andal*. [Internet]. 2021. [Consultado 20 enero 2023]; 32 (2):155-59. Disponible en: DOI: 10.37351/2021322.9
41. Moraima Márquez S, Lacruz U Julio César, López Francisco, Borges Rafael. Sobrevida en pacientes con cáncer de mama triple negativo. *Rev Obstet Ginecol Venez*. [Internet]. 2012 [Consultado 16 mayo 2023]; 72(3): 152-160. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322012000300003&lng=es.

42. Sánchez S.P, Benítez B.L. Receptores estrogénicos alfa y beta en el cáncer de mama. La biología molecular en la clínica. [Internet]. 2003. [Consultado 21 enero 2023]; 1 (3): 159-161. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/actmed/am-2003/am033g.pdf>
43. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest. [Internet]. 2011. [Consultado 23 enero 2023]; 121 (7): 2750-67. Disponible en: doi: 10.1172/JCI45014. PMID: 21633166; PMCID: PMC3127435.
44. Cao L, Niu Y. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods. Cancer Biol Med. [Internet] 2020. [Consultado 24 enero 2023]; 17 (2): 293-306. Disponible en: doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0465. PMID: 32587770; PMCID: PMC7309458.
45. American Cancer Society. Comprensión de un diagnóstico de cáncer de seno. [Internet]. 2019 [Consultado 16 mayo 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/9020.00.pdf>
46. González OE. Terapias alternativas a la radioterapia y quimioterapia en el cáncer de mama [Tesis grado en medicina]. Santander, Facultad De Medicina Universidad De Cantabria. 2019. [Internet]. [Consultado 27 enero 2023]. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/19454>
47. Rocha APF, Marquez IS, Sousa MDB. Tratamiento con quimioterapia para câncer de mama. Rev Bras Interdiscip Saúde - ReBIS. [Internet]. 2023 [Consultado 27 enero 2023]; 5 (1): 11-5. Disponible en: https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:KDAgLSbuXSsJ:scholar.google.com/+quimioterapia+en+cancer+de+mama+&hl=es&as_sdt=0,5&as_ylo=2023

48. Prieto AV. Cáncer de mama: tratamientos inmunológicos. CLINICA. [Internet]. 2019. [Consultado 30 enero 2023]; 27 (1): 33-41. Disponible en: <https://revistas.uva.es/index.php/clinica/article/view/3079>
49. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 7628, Boric Acid; [Consultado 10 febrero 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boric-Acid>
50. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 4349738, (6-hydroxynaphthalen-2-yl) boronic Acid; [Consultado 11 febrero 2023]. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6-hydroxynaphthalen-2-yl_boronic-Acid
51. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 11775704, 9-Phenanthreneboronic Acid; [Consultado 12 febrero 2023]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9-Phenanthreneboronic-Acid>
52. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 21988878, (9H-Fluoren-2-yl) boronic acid; [Consultado 13 febrero 2023]. Disponible en: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9H-Fluoren-2-yl_boronic-acid
53. CIMA. Ficha técnica DOXORUBICINA [Internet]. España. 2016 [Consultado 14 febrero 2023]. Disponible en: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/73266/FT_73266.pdf
54. Fernández AL. Doxorrubicina: pasado, presente y futuro en quimioterapias [Tesis grado en biología]. Universidad de Oviedo. 2021. [Internet]. [Consultado 13

febrero 2023]. Disponible en:
https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/63178/TFG_LuciaFernandezAlvarez.pdf?sequence=4&isAllowed=y

55. Segretía ME. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). [Internet]. ArgenBio. [Consultado 27 febrero 2023]. Disponible en: https://www.argenbio.org/images/La_biotechnologia/Cap_2/Cultivos_celulares_I.pdf
56. Tavira Montalván CA, Ortega García A, Dávila González I, Estrada Mondaca S y Meneses Acosta. Alcances y perspectivas del cultivo de células animales en la biotecnología farmacéutica. Rev Mex de Cien Farma, 2009; 40 (4): pp.35-46.
57. Lynch SS. Interacciones farmacológicas [Internet]. University of California San Francisco School of Pharmacy: MDS; Julio 2022 [Consultado 15 marzo 2023]. Disponible en <https://biblioguias.unex.es/c.php?g=657103&p=4627280>
58. Pérez JU. Bases farmacocinéticas de las interacciones farmacológicas [Internet]. Slideshare; Julio 2016. [Consultado 15 marzo 2023]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/Marisel20/interacciones-fc-en-la-terapeutica>
59. American Type Culture Collection. 4T1 Product Sheet [Internet] USA. 2021. [Consultado 07 marzo 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-2539>
60. Mancipe JC. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UNA FRACCIÓN DE *Caesalpinia spinosa* EN UN MODELO DE CÁNCER MAMARIO MURINO. [Internet] 2013. [Consultado 07 marzo 2023]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/12032/MancipeVargasJuanCarlos2013.pdf?sequence=1#:~:text=Las%20c%C3%A9lulas%20tumorales%20de%20la,anat%C3%B3micamente%20en%20el%20sitio%20correcto>

61. Gloria SG y Mauricio C. Protección celular antioxidante y respuesta adaptativa inducida por estímulos oxidativos crónicos. Actual Biol [Internet]. 2016. [Consultado 08 marzo 2023] 38(104). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/292675837_Proteccion_celular_antioxidante_y_respuesta_adaptativa_inducida_por_estimulos_oxidativos_cronicos/download
62. American Type Culture Collection. C2C12 Product Sheet [Internet] USA. 2021. [Consultado 08 marzo 2023]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/crl-1772>
63. Biomodel. Ensayo de viabilidad celular (actividad metabólica) por reducción del compuesto MTT [Internet]. [Consultado 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
64. Clemencia CP. DETERMINATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF EXTRACTS, FRACTIONS, OR SUBSTANCES, BY MEANS OF THE MTT TEST. [Internet]. 2006. [Consultado 14 marzo 2023]. Disponible en: http://publications.iupac.org/cd/medicinal_chemistry/Practica-IV-2.pdf
65. Estrella LA. Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología. Rep Ac USMP. [Internet]. 2019. [Consultado 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://1library.co/document/y96wmndy-metodos-determinar-viabilidad-celularaplicacion-odontologia.html>
66. Checa Rojas, A. Tinción de Cristal Violeta (0.5%) en cultivo de células adherentes. Conogasi, Conocimiento para la vida. 2018. [Consultado 14 marzo 2023]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/tincion-de-cristal-violeta-0-5-en-cultivo-de-celulasadherentes/>
67. Toccas MLS. Estudio del efecto del fucoidan de Lessonia trabeculata nativa (alga parda) sobre la capacidad migratoria y clonogénica de la línea celular de carcinoma mamario murino 4T1 [Tesis de grado BMP]. Lima Peru: Universidad

Nacional Mayor de San Marcos; 2020. [Consultado 25 marzo 2023]. Disponible en:

https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/13998/Toccas_sm.pdf?sequence=1&isAllowed=

68. Putri, H., Jenie, R., Handayani, S., Kastian, R., Meiyanto, E. Combination of Potassium Pentagamavunon-0 and Doxorubicin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Inhibits Metastasis in Breast Cancer Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, [Internet]. 2016 [Consultado 25 marzo 2023]; 17(5): 2683-2688. Disponible en: http://journal.waocp.org/article_32459.html
69. Zhou, F.; Feng, R.; Dai, O.; Yang, L.; Liu, Y.; Tian, Y.-C.; Peng, C.; Xiong, L. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Phenanthrene Derivatives Isolated from *Bletilla striata* on A549 Lung Cancer Cells. *Molecules* 2022, 27, 3519
70. Spaczyńska, E.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Malarz, K.; Kos, J.; Gonec, T.; Oravec, M.; Gawecki, R.; Bak, A.; Dohanosova, J.; Kapustikova, I.; et al. Design and synthesis of anticancer 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides with a p53 independent mechanism of action. *Sci. Rep.* 2019, 9, 6387

71. ANEXOS.

- Artículo publicado derivado de la tesis.







inorganics



Article

Reverse Screening of Boronic Acid Derivatives: Analysis of Potential Antiproliferative Effects on a Triple-Negative Breast Cancer Model In Vitro

Miguel Ortiz-Flores ¹, Marcos González-Pérez ¹, Andrés Portilla ¹, Marvin A. Soriano-Ursúa ¹, Javier Pérez-Durán ², Araceli Montoya-Estrada ³, Guillermo Ceballos ^{1,*} and Nayelli Nájera ^{1,*}

¹ Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomás, Alc. Miguel Hidalgo, Mexico City 11340, Mexico

² Reproductive and Perinatal Health Research Department, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales 800, Alc. Miguel Hidalgo, Mexico City 11000, Mexico

³ Coordination of Gynecological and Perinatal Endocrinology, Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes", Montes Urales 800, Alc. Miguel Hidalgo, Mexico City 11000, Mexico

* Correspondence: gceballos@ipn.mx (G.C.); nnajerag@ipn.mx (N.N.); Tel.: +52-55-57296000 (G.C. & N.N.)

Abstract: It has been demonstrated that different organoboron compounds interact with some well-known molecular targets, including serine proteases, transcription factors, receptors, and other important molecules. Several approaches to finding the possible beneficial effects of boronic compounds include various in silico tools. This work aimed to find the most probable targets for five aromatic boronic acid derivatives. In silico servers, SuperPred, PASS-Targets, and Polypharmacology browser 2 (PPB2) suggested that the analyzed compounds have anticancer properties. Based on these results, the antiproliferative effect was evaluated using an in vitro model of triple-negative breast cancer (4T1 cells in culture). It was demonstrated that phenanthren-9-yl boronic acid and 6-hydroxynaphthalen-2-yl boronic acid have cytotoxic properties at sub-micromolar concentrations. In conclusion, using in silico approaches and in vitro analysis, we found two boronic acid derivatives with potential anticancer activity.

Keywords: boron; boronic; breast cancer; anticancer drugs; antiproliferative effect



Citation: Ortiz-Flores, M.;

González-Pérez, M.; Portilla, A.;

Soriano-Ursúa, M.A.; Pérez-Durán, J.;

Montoya-Estrada, A.; Ceballos, G.;

Nájera, N. Reverse Screening of

Boronic Acid Derivatives: Analysis of

Potential Antiproliferative Effects on a

Triple-Negative Breast Cancer Model

In Vitro. *Inorganics* **2023**, *11*, 165.

<https://doi.org/10.3390/inorganics11040165>

Academic Editor: Michael A. Beckett

Received: 15 March 2023

Revised: 30 March 2023

Accepted: 31 March 2023

Published: 14 April 2023



Copyright: © 2023 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

In the last few years, boron-containing compounds (BCC) have gained great relevance due to their potential use in different medicinal chemistry and pharmacology areas [1–3]. The interest is based mainly on their chemical properties, making boron a versatile precursor for chemical reactions due to its reactivity, stability, and low toxicity [4].

Alkyl or aryl boronic acid derivatives are the most common BCC. They have been used as catalysts and precursors in several synthetic reactions [4]; furthermore, these compounds can interact with electron-donating groups, such as nitrogen or oxygen, and abundant atoms of macromolecules, such as receptors, enzymes, or nucleic acids [5]. These characteristics point to boronic acid derivatives as compounds with many potential therapeutic applications [5].

Based on these facts, it has been demonstrated over recent years that different BCC, including organoboron compounds, interact with several molecular targets; among these are serine proteases, transcription factors, receptors, and other important molecules [1,5]. Their induced effects have led to clinical trials. Some compounds have been approved by the FDA [6,7], i.e., Bortezomib and Ixazomib, which are proteasome inhibitors used for the treatment of multiple myeloma [6], Tavaborole for onychomycosis, Crisaborole as an inflammation modulator, and Vaborbactam as a β -lactamase inhibitor used in combination with antibiotics for some antimicrobial-resistant agents [6].

Other well-reported and reviewed effects of BCC [1,5] include the inhibition of viral replication, as well as the inhibition of fungal, bacterial, and protozoal growth and reproduction [8], and applications as delivery systems for some drugs [9].

Several approaches to finding the possible beneficial effects of boronic compounds interacting with potential therapeutic targets include *in silico* tools such as reverse screening [10,11]. This approach can determine the probability of ligand–protein interactions by evaluating the molecule fit inside the binding pocket of a protein target by docking and scoring the key interactions of pharmacophore group(s) in the molecule and the targets [12]. Several servers to perform this process exist, each providing a score that ranks the possible targets based on probability [13].

In this study, the main objective was to find the most probable targets for five aromatic boronic acid derivatives (Figure 1) and evaluate their probable effects as proliferation inhibitors in an *in vitro* model of a triple-negative type of breast cancer.

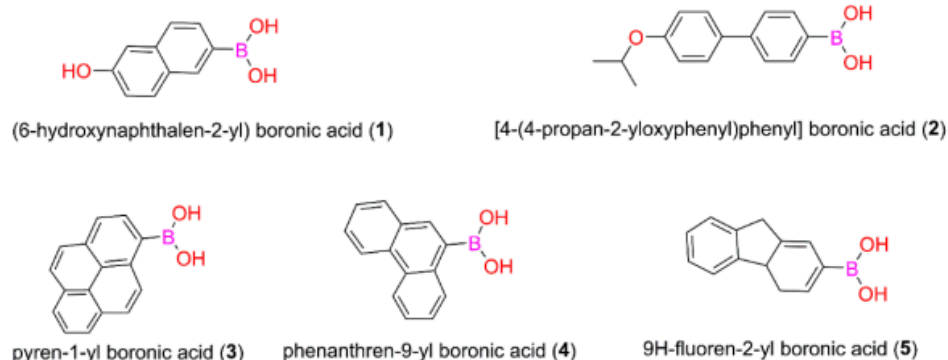


Figure 1. Chemical structures and IUPAC names of selected boronic acid derivatives. See the methods section regarding the selection procedure.

2. Results and Discussion

2.1. Prediction of Probable Biological Activity

In searching for the probable biological activity, the Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) online server was employed (see the materials section for details) [14]. Pa (probable activity) and Pi (probable inactivity) are the main outcomes in this analysis. The compounds showing a higher Pa value than Pi are considered possible candidates for biological activity [15,16]. Predicted biological activities are ranked according to the prediction ratio Pa/Pi (Figure 2). Notably, possible actions on peptidyl transferase, 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase 1, and estradiol 17- β dehydrogenase were often suggested; they are linked to some breast cancer cell proliferation [17–19].

2.2. Therapeutic Target Prediction

To explore the most probable therapeutic targets, SuperPred, PASS-Targets, and Polypharmacology browser 2 (PPB2) were used (see the Section 4 for details). The predictions obtained from the Super-PRED web server [20] for those targets with at least 80% ligand–protein interaction probability are shown in Figure 3. Most of the included proteins were suggested as targets for cancer.

On the other hand, the best 15 predicted targets using the algorithm Extended Connectivity fingerprint ECfp4 NN(ECfp4) + NB(ECfp4) of the Polypharmacology browser 2 server [21] are shown in Table 1.

Similarly, using the PASS-Targets server [22], the potential interactions of the five organoboron compounds with the molecular targets of its database were determined, as shown in Figure 4.

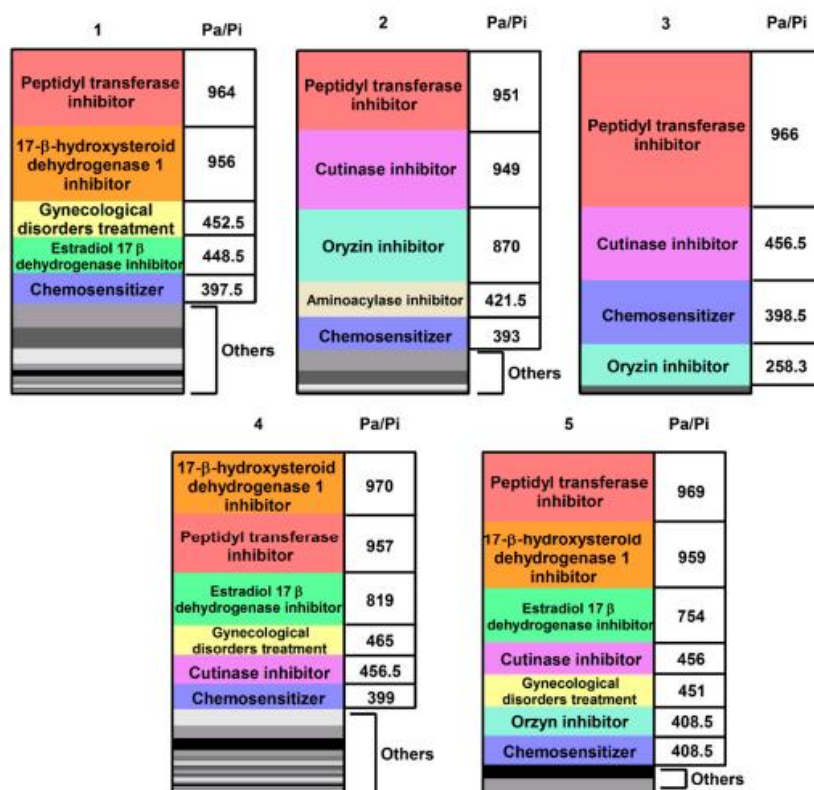


Figure 2. Most probable biological activities predicted by PASS online for the five compounds. Activities were ranked according to the ratio (Pa/Pi). Numbers on the panels indicate the corresponding BCC in Figure 1.

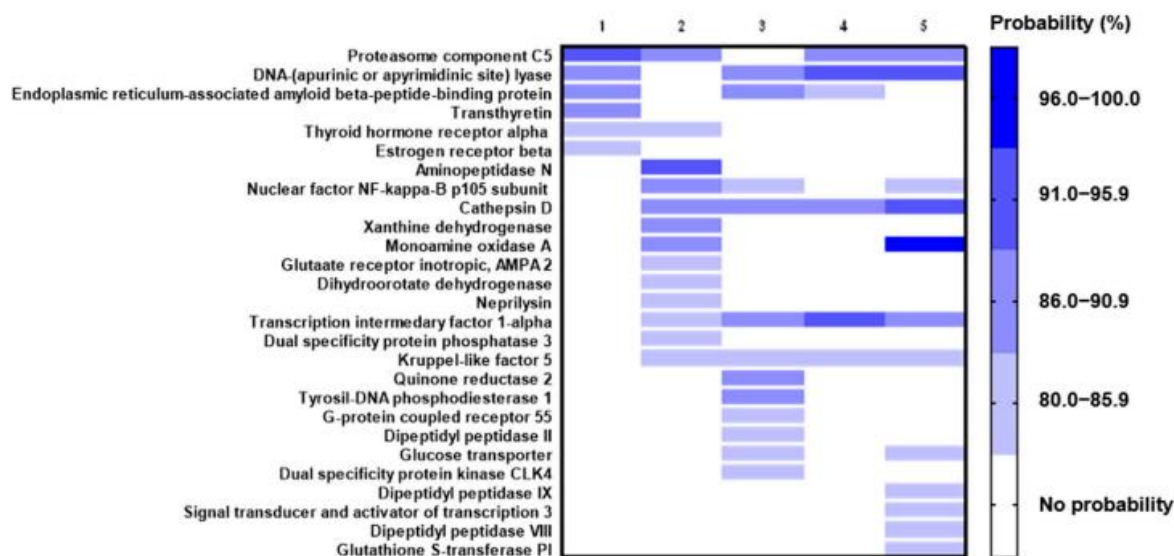


Figure 3. Most probable targets for each evaluated compound (probability ≥80%) according to the Super-PRED server. Numbers on the top of the panel indicate the corresponding BCC in Figure 1.

Table 1. Best 15 predicted targets, represented as UniProtKB entries (see Table S1 for protein names), for each evaluated compound using Polypharmacology browser 2 servers.

Compound				
1	2	3	4	5
Q92731	O00763	P05177	P22303	P35462
P11474	Q13085	Q07820	P09917	P14416
P00918	P09917	P31645	P06276	P11229
Q8TDS4	P08588	Q92731	P11474	P21917
P00915	P45452	P04818	Q9BQF6	Q92731
O43570	P13945	P11474	Q92731	P06401
Q16790	P14780	P08908	P05177	P11474
P14061	P29274	Q13547	P08908	P28335
P37059	P08253	P40238	P27338	P28223
Q13627	P37231	P50406	P40238	P35968
P05067	Q07869	P22303	P00918	P41595
P00533	Q9Y5N1	P09874	Q07820	P08908
P36888	P03956	Q01959	P09874	P20309
P11511	P50281	P28223	P31645	P27338
P08684	P21453	Q9UBN7	P21397	P35367

The numbers of compounds on the top indicate the corresponding BCC in Figure 1.

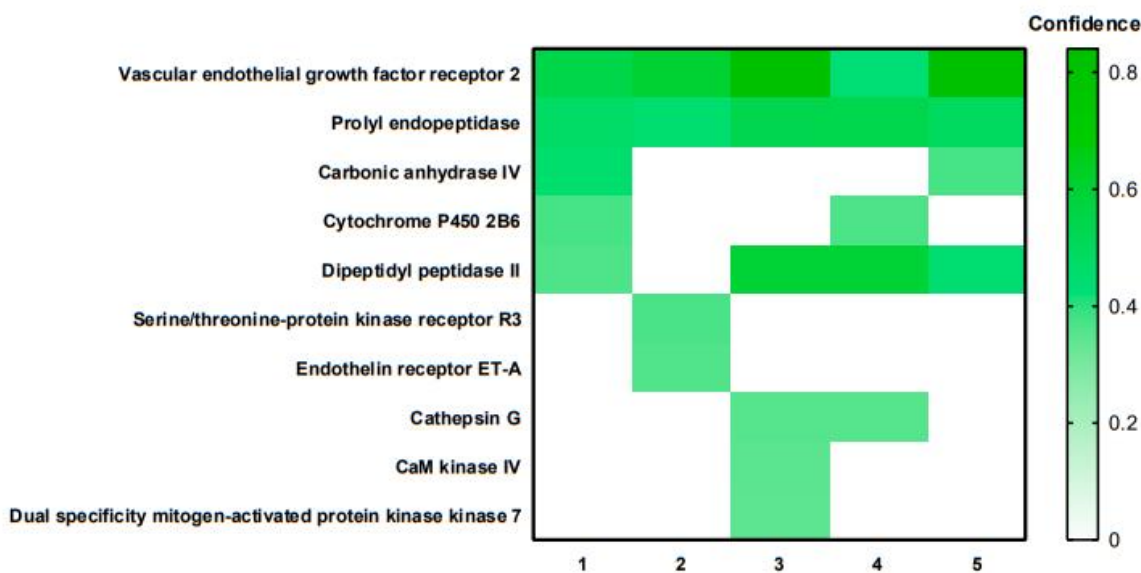


Figure 4. Predicted targets with confidence of ≥ 0.35 for each evaluated compound according to the PASS-Targets server. Numbers below the confidence square indicate the corresponding BCC in Figure 1.

Common targets among compounds and among different servers were used to find associated diseases where the proteins are involved using MalaCards Human Disease Database (see the materials section for details). (Figure 5), and the five best-ranked associated diseases according to the MalaCards database (available at <https://www.malacards.org>, accessed on 1 November 2022) [23] were obtained and classified (Figure 6).

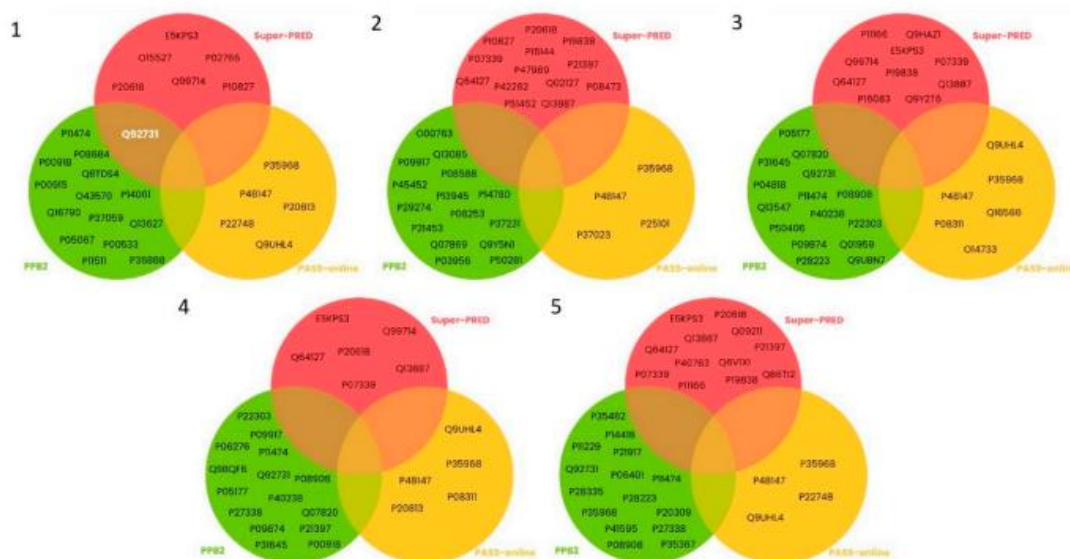


Figure 5. Venn diagrams with target prediction comparisons obtained from the three servers. Numbers on each triad indicate the corresponding BCC in Figure 1.

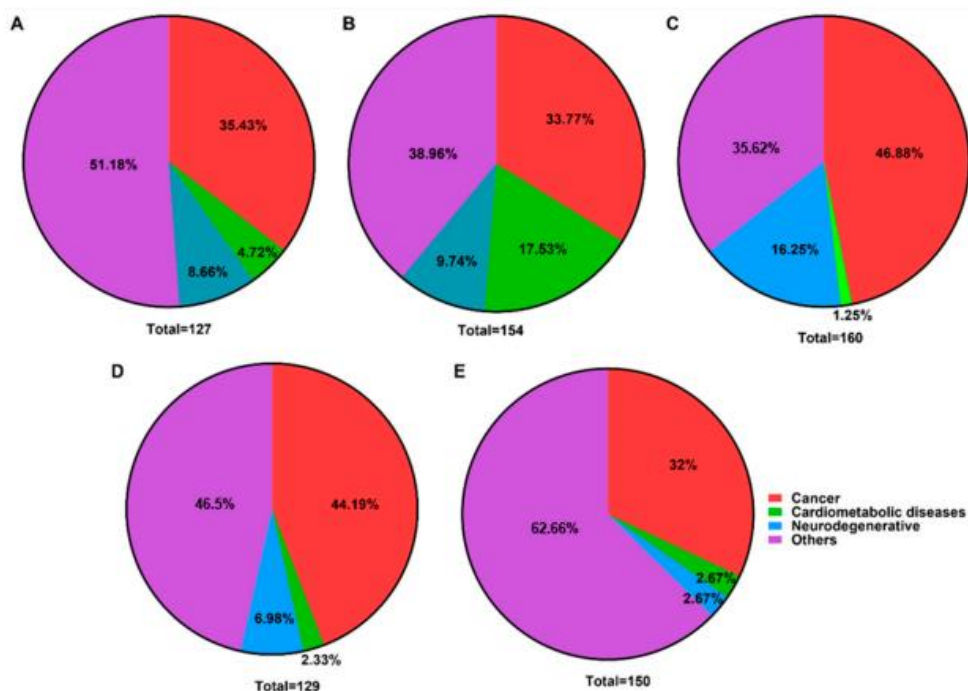


Figure 6. Percentages of diseases associated with each therapeutic target of evaluated compounds. Numbers on each pie chart indicate the corresponding BCC in Figure 1.

The results obtained suggested, with high probability, that the main effects of the analyzed molecules could be related to cancer (see the discussion section for details). Considering all predictions, the effects of selected BCC were evaluated in 4T1 cells in culture, a model of triple-negative breast cancer.

2.3. T1-Cell Viability Dose-Response Curves

To test the potential antiproliferative effects of the analyzed compounds in 4T1 cells in culture, doxorubicin [0.00001–10 μM] was used as a positive control. A concentration-dependent decrease in cell viability was determined (Figure 7A). On the other hand, the effects of boric acid [0.2–1.2 μM] were analyzed. As expected (since boric acid requires millimolar concentrations to induce a significant disruption in cancer cells [24,25]), the results showed a slight nonsignificant decrease ($\approx 20\%$) in cell viability (Figure 7B). These results were considered as a negative control.

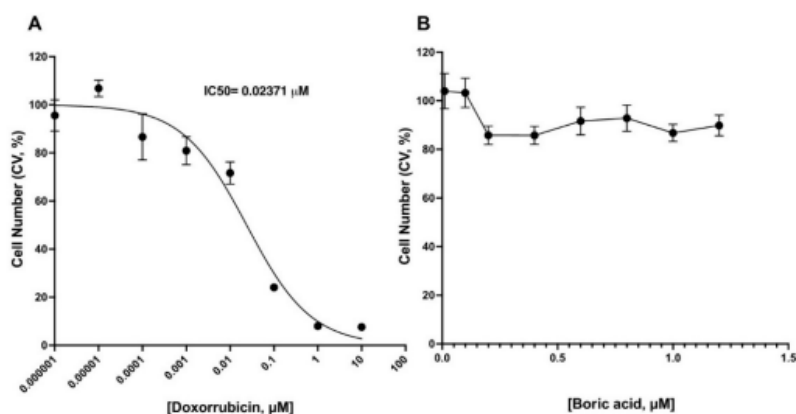


Figure 7. The effect of control drugs on the 4T1 cells. (A). Doxorubicin (positive control) induced a concentration-dependent decrease in 4T1 cell viability. (B). Analysis of the effects of boric acid (negative control) on 4T1 cell viability. Analysis was performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm standard error (SE).

The effects of 9H-fluoren-2-yl boronic acid (5) [0.0001–300 μM] on 4T1 viability were analyzed. Even at higher concentrations than for the other tested BCC, no significant effects of this molecule on cell viability were found (Figure 8A).

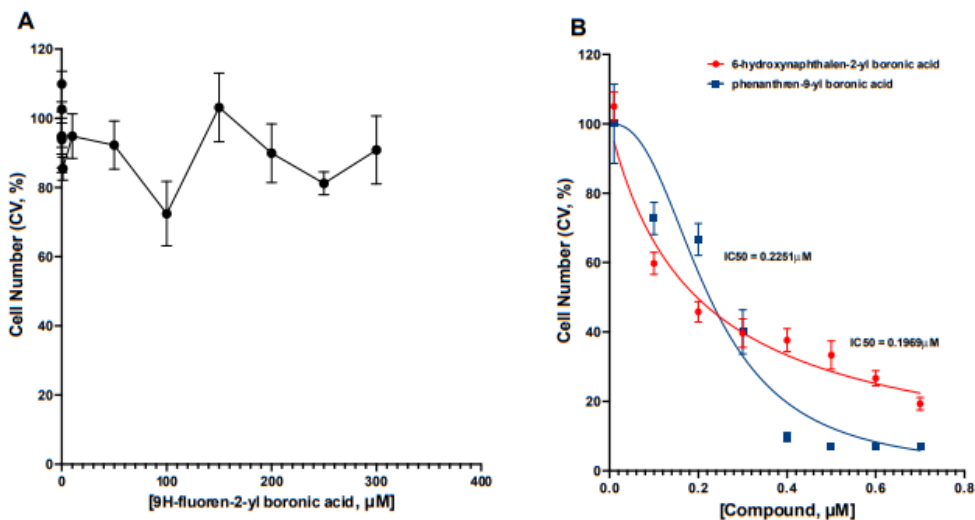


Figure 8. The effects of BCC on 4T1 cell viability. (A). Effect of compound 1 on cell viability. (B). Effects of compound 4 and compound 5 on cell viability. Assays were performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm SE of the cell viability of 4T1 cells in culture.

The effects of 6-hydroxynaphthalen-2-yl boronic acid (**1**) were analyzed (Figure 8B). A concentration-dependent decrease in cell viability was found, with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.1969 μ M.

Similarly, phenanthren-9-yl boronic acid (**4**) [0.1–0.7 μ M] induced a concentration-dependent decrease in cell viability (Figure 8B), with an IC_{50} value of 0.2251 μ M.

The evaluation of the effects of [4-(4-propan-2-yloxyphenyl)phenyl] boronic acid (**2**) and pyren-1-yl boronic acid (**3**) was limited, since these molecules tend to precipitate when they are diluted in RPMI medium (a typical culture medium), making trustable *in vitro* assays not feasible. A clear relationship was not observed with the water/lipid solubility of these compounds, as compounds **2** and **3** were not predicted as the most water- or lipid-soluble compounds (Table S2).

2.4. Effects of BCC Regarding Antiproliferative Effects on Noncancer Cells

After finding that compounds **1** and **4** induced a concentration-dependent decrease in cell number (cytotoxicity) in the cancer cell model *in vitro*, to examine their effects in a noncancer-related cell type in culture, we chose C2C12 myoblasts for analysis. These cells are of skeletal muscle origin and do not share the cancer-related characteristics of the 4T1 cell type. Compound **1** induced a slight decrease of close to 20% in cell number (Figure 9A), and compound **4** induced a decrease of 28% in cell number (Figure 9B); the results suggest that the effects of these BCC are selectively higher in cancer cells than in noncancer cells.

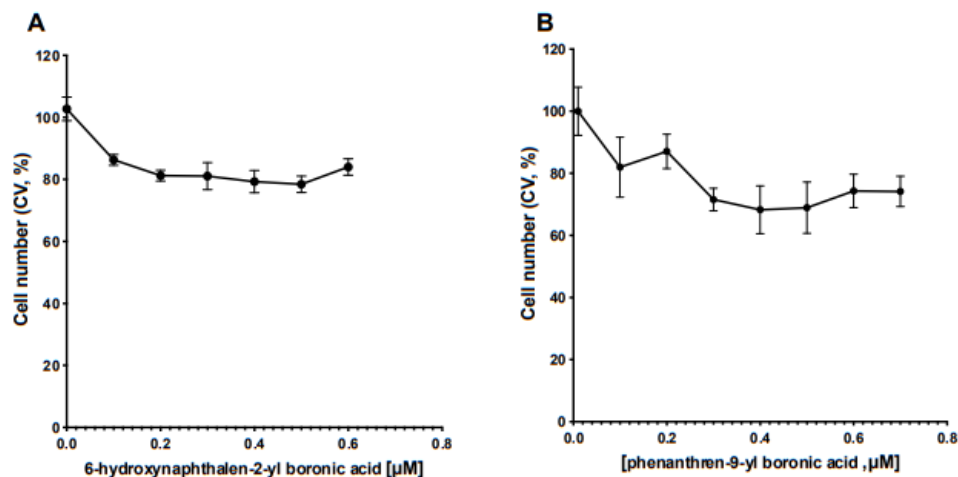


Figure 9. Toxicity evaluation in non-cancer cells. (A). Effects of 6-hydroxynaphthalen-2-yl boronic acid (**1**) on cell viability in C2C12. (B). Effects of phenanthren-9-yl boronic acid (**4**) on myoblasts in culture. Analysis was performed in triplicate. Data are presented as the mean \pm SE.

3. Discussion

Currently, one of the first approaches to finding the probable biological activity of compounds is through *in silico* tools [10,26,27]. In this context, reverse screening is one of the most useful methods [10]. In this work, we used this methodology to estimate the most probable therapeutic action of five boronic acid derivatives. Firstly, we utilized the Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) online server [14]; predictions made using this tool are based on the analysis of structure–activity relationships (SAR) in an extensive compound database. The results show the most probable biological activity of compounds ranked according to the active and inactive probabilities ratio (Pa/Pi), meaning that the higher the ratio, the higher the probability of activity. The most frequently predicted activities for all analyzed compounds were as a peptidyl transferase inhibitor and as a chemosensitizer. These results suggest that the five compounds can serve as antibiotics, inhibiting peptide bond formation in bacteria; however, compounds with these

abilities are also involved in cancer progression, and they are studied to develop new anticancer drugs [28,29]. Moreover, these compounds can function as drugs that make tumor cells more sensitive to the effects of chemotherapy [28]. The enzymes related to steroid metabolism, suggested as potential targets, are also considered a target in breast cancer drug design [18,19].

Following the methodological sequence proposed in this work, we predicted the most probable therapeutic targets for each derivative in three online servers. Firstly, according to the Super-PRED server [20], which makes predictions based on machine learning models using the ChEMBL database [30], the probability of binding to 646 human targets, considering 2D similarities, was analyzed. Among the probable targets for each evaluated compound with a binding probability of $\geq 80\%$ were proteasome component C5, DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase, cathepsin D, transcription intermediary factor 1- α , and Kruppel-like factor 5; all these have been explored or suggested as potential targets in certain types of cancer, including breast cancer [17,19].

A second target prediction was then performed using the Polypharmacology browser 2 (PPB2) server [21]. This tool also uses ChEMBL data [30], but it determines ligand similarities using three descriptors (molecular fingerprints encoding composition (MQN), molecular shape and pharmacophores (Xfp), and substructures (ECfp4)), and it uses a combination of mathematical algorithms (nearest neighbor (NN) searches and naïve Bayes (NB) machine learning). Based on previous reports, the Extended Connectivity fingerprint ECfp4 NN(ECfp4) + NB(ECfp4) algorithm was employed since it provides the best recall and precision values compared to other algorithms.

Table 1 shows the first fifteen predicted targets for each compound; four of the compounds (all except for compound 2) share two targets: estrogen receptor alpha (P11474) and estrogen receptor beta (Q92731). Similarly, compounds 3 and 4 have five targets in common: cytochrome P450 1A2 (P05177), induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (Q07820), poly [ADP-ribose] polymerase-1 (P09874), acetylcholinesterase (P22303), and serotonin transporter (P31645). These results suggest that at least four of the tested boronic acid derivatives are highly likely to share a mechanism by which they exert their pharmacological activity.

Finally, a third server to conduct target prediction was utilized: PASS-Targets [22]. This server implements QSAR modeling on data available in the ChEMBL database [30] over 930 human protein targets. The probability of interaction vs. no interaction determines the target scoring (confidence). The higher the confidence, the higher the chance of the positive prediction being true. Considering a confidence of 0.35, the predicted targets for the five organoboron compounds are presented in Figure 4; vascular endothelial growth factor receptor 2 and prolyl endopeptidase were the two common targets in at least four compounds. Both are also considered breast cancer targets [31,32].

After the analysis, targets predicted in common were depicted in Venn diagrams. Two proteins were targets on the three servers: estrogen receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2—both intimately related to neoplastic pathology growth [18,32].

After the target prediction, the MalaCards database (a database of 22,091 human diseases, modeled in gene cards) [23] was searched for the top five associated diseases (Figure 5). This approach allows us to classify diseases according to (1) the reliability of evaluation and (2) the diseases with the greatest morbi-mortality among the world's population. The results suggested that cancer, cardiometabolic diseases, neurodegenerative diseases, and others (including those diseases for which pharmacological evaluation in vitro or in vivo is complicated, as well as less frequent diseases or those with a favorable survival outlook with adequate treatment, such as rheumatoid arthritis, anxiety, osteoporosis, etc.) are the most probable therapeutic targets for the selected boronic compounds.

The merged results from the all three servers show that approximately 32–46% of the protein targets are associated with cancer, which is the second most abundant subgroup after the “other” category (~35–62%), summarizing multiple diseases. Thus, the results from the associated disease analysis and the first approach on PASS that considered the

possible activity of the organoboron compounds as chemosensitizers formed the basis for the evaluation of the boronic acid derivatives as possible drugs for cancer treatment in a model of stage IV breast cancer: 4T1 cells in culture [33].

Breast cancer is the most common malignant disease in women and is among the leading causes of cancer-related death in women worldwide [34]. The 4T1 breast cancer model is a triple-negative ductal carcinoma negative for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expression [33,35]. Interestingly, no specific therapy is available for patients with this cancer subtype, who have a poor prognosis [36].

In the absence of therapeutic targets, chemotherapy plays a vital role in treatment. Doxorubicin (DOX), an anthracycline with anticancer activity, is one of the most effective chemotherapeutic agents against solid tumors, including breast cancer [6]. DOX triggers cell death by apoptosis and necrosis. Even when DOX is effective in cancer treatment, it induces several adverse effects such as myelosuppression, nausea/vomiting, mucositis, diarrhea, and cardiotoxicity that progresses to congestive heart failure [6]. The search for new molecules that can contribute to breast cancer treatment is highly active, seeking greater potency and fewer adverse effects.

As the *in silico* analysis suggested that the compound's possible effects could be related to cancer, we employed a cell line for which growth does not depend on hormonal stimuli and used DOX as a positive control. As expected, the results showed that boronic acid had no effect on the cell number, being considered a negative control. Unfortunately, compounds **2** and **3** precipitated when solubilized in the cell culture medium, and their effects were not evaluated. The reason for this observed phenomenon was not elucidated, but the relationship with water/lipid solubility is unsupported for the predicted ClogP or LogS values (see Table S2). The cLogP values for compounds **2** and **3** suggest higher hydrophobicity than for the other three tested BCC; assays using nonpolar solutions as vehicles could improve solubility, but this was beyond the scope of the current study.

The analysis of the effects of compound **1** ($IC_{50} = 0.1969 \mu\text{M}$) and compound **4** ($IC_{50} = 0.2251 \mu\text{M}$) showed that both compounds induced cytotoxic and perhaps anti-neoplastic effects. In the structure of both compounds, a conjugate system (*i.e.*, naphthalene and phenanthrene moieties) is present, suggesting that this molecular feature is relevant for the induction of antiproliferative effects, at least in the model used, and further studies in this regard are warranted. Interestingly, compound **5** induced no effects. Besides boric acid and phenylboronic acid, which are active in cancer cells at supra-micromolar concentrations [24,37], and the active compounds in this study, it is one of the BCC, with a boron atom and at least two hydroxyl groups. Moreover, this molecule shares two benzyl groups, as do compounds **1** and **4**. Still, such six-member cycles are separated by a five-member cycle, which uncouples the resonance effect of the naphthalene moiety, thus reinforcing the proposal.

The effects of DOX were more potent ($IC_{50} = 0.02371 \mu\text{M}$) as compared to those of compounds **1** ($IC_{50} = 0.1969 \mu\text{M}$) and **4** ($IC_{50} = 0.2251 \mu\text{M}$). However, their effects were induced in the sub-micromolar range and have the potential for more detailed studies. These results warrant further studies to determine the pathways involved in the induced effects, as well as the inclusion of other structurally related compounds.

Although studies including similar molecules are scarce, our results agree with the reported results of F. Zhou *et al.* exploring the cytotoxic effects of phenanthrene derivatives from extracts of *Bletilla striata* against A549 lung cancer cells ($IC_{50} < 10 \mu\text{M}$) [38]. These authors found that complex molecules such as bi-phenanthrenes induced stronger effects than simple phenanthrenes, with cytotoxic effects at levels higher than $100 \mu\text{M}$. This indicates that the presence of boronic acid in simple phenanthrenes can increase their potency, as our results also suggest.

Our results also agree with the results reported by E. Spaczynska *et al.* on the anticancer effects of naphthalene derivatives ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$) [39]. Additionally, our results could be related to the reports of a dipeptidyl boronate derivative active on triple-negative breast cancer cells [40], albeit that the compound did not have the moieties suggested as key in the

current study (exposed boron-gem-dihydroxyl and two conjugated six-membered cycles). In relationship with our findings, it was also reported that sodium borates (at concentrations higher than 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) have antiproliferative effects in breast cancer cells. Although the involved mechanism for this cytotoxicity is unclear, the results suggested the involvement of the PD-1/PD-L1 signaling pathway and cytokine modulation [41]. In addition, boronic acids have been proposed to act as arginase inhibitors and potent immunomodulators of the response to many types of cancer [42].

Our results in skeletal muscle myoblasts, a noncancer cell culture, are relevant since we found no cytotoxic effects of compounds **1** and **4**, suggesting that the effects of these molecules are exerted only in cancerous cells, and this may decrease chemotherapeutic toxicity in normal cells.

4. Materials and Methods

4.1. Compound Selection

Five boronic acid derivatives (Figure 1) were selected based on the main molecular features relevant to the protein–ligand interaction establishment of bioactive compounds [43–45], mainly a molecular weight lower than 500 g/mol, the inclusion of an aromatic moiety, and the presence of electro-donating/attracting atoms [46].

4.2. Prediction of Probable Biological Activity and Therapeutic Target Screening

As a first approach to searching for the probable biological activity of the selected compounds, an analysis in the Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) online server was performed (<http://www.way2drug.com/passonline/>, accessed on 10 October 2022) [14]. After that, three reverse-screening online servers were used to explore the most probable therapeutic targets for each compound; the SMILES identifier for each compound was used to start the calculation based on the derived structure for SuperPred (https://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php, accessed on 29 March 2022) [20], PASS-Targets (<http://www.way2drug.com/passtargets/>, accessed on 29 March 2022) [22], and Polypharmacology browser 2 (PPB2) (<https://ppb2.gdb.tools/>, accessed on 29 March 2022) [21], using the Extended Connectivity fingerprint ECfp4 NN(ECfp4) + NB(ECfp4) method for the latter.

Finally, common targets among compounds and among different servers were used to find associated diseases wherein the proteins are involved using the MalaCards Human Disease Database (<https://www.malacards.org/>, accessed on 29 March 2022) [23].

4.3. Pharmacological Assessment

Dose–response curves were developed for each compound. We evaluated cell viability using a model of the triple-negative type of breast cancer in vitro—4T1 cells in culture. Additionally, we evaluated the effect of the compounds in a non-tumor cell line (C2C12, mouse myoblasts). Doxorubicin [0.00001–10 μM] was used as a positive control, while boric acid [0.2–1.2 μM] was used as a negative control.

4.4. Cell Culture

Type 4T1 cells (ATCC CRL-2539) were cultured under standard conditions, using RPMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic, with a controlled temperature and atmosphere at 37 °C and 5% of CO₂, respectively. Cells were grown in a monolayer to 80% completeness.

C2C12 cells (ATCC CRL-1772) were cultured using DMEM medium under the same standard conditions.

4.5. Estimation of the Number of Cells by Crystal Violet Assay

A total of 5×10^4 4T1 cells were seeded in 96-well plates. The next day, the cells were treated with different concentrations of the compounds for 5 days under standard culture conditions, exchanging the culture medium on Day 3. At the end of the 5 days, the cells were washed with $1 \times$ HBSS and incubated with 50 μL of 0.5% crystal violet staining

solution for 20 min at room temperature on a bench rocker. After washing three times with distilled water, the plate was inverted to remove any remaining liquid. The plate was air-dried, 200 μ L of glacial acetic acid 0.2M was added, and the plate was incubated for 20 min at room temperature. The optical density of each well was obtained at 570 nm (OD 570) in a plate reader. Viability was expressed as the percentage of that for the control group.

4.6. Statistics

All assays were performed in triplicate in at least two independent assays. The results are presented as the mean \pm SEM. Statistical analysis and IC₅₀ determinations were performed using GraphPad Prism version 9.0 software.

5. Conclusions

In the present work, by using *in silico* and *in vitro* approaches, we demonstrated the relationship between the potential anticancer activity of two boronic acid derivatives (6-hydroxynaphthalen-2-yl boronic acid (1) and phenanthren-9-yl boronic acid (4)) suggested by reverse screening and their antiproliferative effect on breast cancer cells. However, further study is required to explore/find the mechanisms involved in the cytotoxic effects of these molecules and to evaluate the relationship of the found effects with interaction on the predicted or suggested targets.

6. Perspectives

In recent years, advances in antitumor treatment have modified the prognosis of patients affected by a wide variety of neoplasms, increasing survival and even complete cure of the disease. In the case of tumors such as breast cancer or lymphoblastic leukemia, cure rates have increased considerably. However, therapeutic success and the consequent increase in survival have also increased the frequency of late complications.

Some adverse effects depend on toxicity in tissues unrelated to the tumor. A clear example is the cardiotoxicity induced by anthracyclines such as doxorubicin, which can produce cardiomyopathy and heart failure in many subjects, even after several years.

The administered dose of doxorubicin is directly related to the appearance of complications. The damage is related to the mechanism of action, which depends on its interaction with DNA and the inhibition of topoisomerase II, the generation of reactive oxygen species, and further damage to DNA. All these mentioned mechanisms damage tumor cells and normal cells, particularly those that are more susceptible, such as skeletal or cardiac muscle.

Consequently, the search for drugs capable of limiting tumor growth without affecting other susceptible cells is an active research point worldwide.

The results reported in this work using *in silico* and *in vitro* methodologies allow us to suggest with a high probability that the boron derivatives 6-hydroxynaphthalen-2-yl boronic acid (1) and phenanthren-9-yl boronic acid (4) could be potential candidates for consideration as antineoplastic drugs with selectivity towards tumor cells without affecting normal cells. The results open different avenues of study, requiring an investigation into the effects of these boronic derivatives in solid tumors of various origins and in combination with traditional antineoplastics, seeking to limit adverse effects and increase antitumor effectiveness.

However, the need to implement new studies to characterize these compounds' effects in depth is clear.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/inorganics11040165/s1>, Table S1. Names of protein targets determined from UniprotKB server. Table S2. cLogP and LogS of tested compounds.

Author Contributions: All authors participated in the conception of the study and in the experimental design and data analysis. M.O.-F., G.C. and N.N. wrote the first draft. All authors revised and edited the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National National Institute of Perinatology, grant no. 2018-1-157 and Instituto Politécnico Nacional grant no. 20220812. The authors would like to thank

the Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional for their financial support of this project.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: Dr. Ceballos is a stockholder of Epirium, Inc. All other authors declare no conflict of interest.

References

- Silva, M.; Saraiva, L.; Pinto, M.; Sousa, M.E. Boronic Acids and Their Derivatives in Medicinal Chemistry: Synthesis and Biological Applications. *Molecules* **2020**, *25*, 4323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Soriano-Ursúa, M.A.; Farfán-García, E.D.; Geninatti-Crich, S. Turning Fear of Boron Toxicity into Boron-containing Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 5005–5018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khan, T.; Igarashi, K.; Tanabe, A.; Miyazawa, T.; Fukushima, S.; Miura, Y.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Matsumoto, A.; Cabral, H.; et al. Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3*, 5030–5039. [[CrossRef](#)]
- Petasis, N.A. Expanding Roles for Organoboron Compounds—Versatile and Valuable Molecules for Synthetic, Biological and Medicinal Chemistry. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60*, 795–798. [[CrossRef](#)]
- Baker, S.J.; Ding, C.Z.; Akama, T.; Zhang, Y.-K.; Hernandez, V.; Xia, Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Futur. Med. Chem.* **2009**, *1*, 1275–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wishart, D.S.; Feunang, Y.D.; Guo, A.C.; Lo, E.J.; Marcu, A.; Grant, J.R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; et al. DrugBank 5.0: A Major Update to the DrugBank Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D1074–D1082. [[CrossRef](#)]
- Song, S.; Gao, P.; Sun, L.; Kang, D.; Kongsted, J.; Poongavanam, V.; Zhan, P.; Liu, X. Recent developments in the medicinal chemistry of single boron atom-containing compounds. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11*, 3035–3059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Farfán-García, E.D.; Kilic, A.; García-Machorro, J.; Cuevas-Galindo, M.E.; Rubio-Velazquez, B.A.; García-Coronel, I.H.; Estevez-Fregoso, E.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Soriano-Ursúa, M.A. Antimicrobial (viral, bacterial, fungal, and parasitic) mechanisms of action of boron-containing compounds. In *Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections*; Bagchi, D., Das, A., Downs, B.W., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2023; pp. 733–754.
- Brooks, W.L.A.; Sumerlin, B.S. Synthesis and Applications of Boronic Acid-Containing Polymers: From Materials to Medicine. *Chem. Rev.* **2015**, *116*, 1375–1397. [[CrossRef](#)]
- Huang, H.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Lin, C.; Chen, S.; Lin, Y.; Mai, S.; Huang, Z. Reverse Screening Methods to Search for the Protein Targets of Chemopreventive Compounds. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Andrade-Jorge, E.; Garcia-Avila, A.K.; Ocampo-Nestor, A.L.; Trujillo-Ferrara, J.G.; Soriano-Ursúa, M.A. Advances of Bioinformatics Applied to Development and Evaluation of Boron-Containing Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2018**, *22*, 298–306. [[CrossRef](#)]
- Lee, A.; Lee, K.; Kim, D. Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11*, 707–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Singh, N.; Chaput, L.; Villoutreix, B.O. Virtual screening web servers: Designing chemical probes and drug candidates in the cyberspace. *Brief. Bioinform.* **2020**, *22*, 1790–1818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lagunin, A.; Stepanchikova, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. PASS: Prediction of activity spectra for biologically active substances. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 747–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khurana, N.; Ishar, M.P.S.; Gajbhiye, A.; Goel, R.K. PASS assisted prediction and pharmacological evaluation of novel nicotinic analogs for nootropic activity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *662*, 22–30. [[CrossRef](#)]
- Goel, R.K.; Singh, D.; Lagunin, A.; Poroikov, V. PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Med. Chem. Res.* **2010**, *20*, 1509–1514. [[CrossRef](#)]
- Yin, L.; Duan, J.-J.; Bian, X.-W.; Yu, S.-C. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* **2020**, *22*, 1–61. [[CrossRef](#)]
- Saha, T.; Makar, S.; Swetha, R.; Gutti, G.; Singh, S.K. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *177*, 116–143. [[CrossRef](#)]
- Ji, X.; Lu, Y.; Tian, H.; Meng, X.; Wei, M.; Cho, W.C. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *114*, 108800. [[CrossRef](#)]
- Nickel, J.; Gohlke, B.; Erehman, J.; Banerjee, P.; Rong, W.W.; Goede, A.; Dunkel, M.; Preissner, R. SuperPred: Update on drug classification and target prediction. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, W26–W31. [[CrossRef](#)]
- Awale, M.; Reymond, J.-L. Polypharmacology Browser PPB2: Target Prediction Combining Nearest Neighbors with Machine Learning. *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *59*, 10–17. [[CrossRef](#)]
- Pogodin, P.; Lagunin, A.; Filimonov, D.; Poroikov, V. PASS Targets: Ligand-based multi-target computational system based on a public data and naïve Bayes approach. *SAR QSAR Environ. Res.* **2015**, *26*, 783–793. [[CrossRef](#)]

23. Rappaport, N.; Nativ, N.; Stelzer, G.; Twik, M.; Guan-Golan, Y.; Stein, T.I.; Bahir, I.; Belinky, F.; Morrey, C.P.; Safran, M.; et al. MalaCards: An integrated compendium for diseases and their annotation. *Database* **2013**, *2013*, bat018. [[CrossRef](#)]
24. Meacham, S.L.; Elwell, K.E.; Ziegler, S.; Carper, S.W. Boric acid inhibits cell growth in breast and prostate cancer cell lines. In *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2007; pp. 299–306.
25. Scorei, R.; Ciubar, R.; Ciofrangeanu, C.M.; Mitran, V.; Cimpean, A.; Iordachescu, D. Comparative Effects of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells. *Biol. Trace Element Res.* **2008**, *122*, 197–205. [[CrossRef](#)]
26. Shaker, B.; Ahmad, S.; Lee, J.; Jung, C.; Na, D. In silico methods and tools for drug discovery. *Comput. Biol. Med.* **2021**, *137*, 104851. [[CrossRef](#)]
27. Vougas, K.; Sakellaropoulos, T.; Kotsinas, A.; Foukas, G.-R.P.; Ntargaras, A.; Koinis, F.; Polyzos, A.; Myriantopoulos, V.; Zhou, H.; Narang, S.; et al. Machine learning and data mining frameworks for predicting drug response in cancer: An overview and a novel in silico screening process based on association rule mining. *Pharmacol. Ther.* **2019**, *203*, 107395. [[CrossRef](#)]
28. Tan, Y.; Li, Y.; Qu, Y.-X.; Su, Y.; Peng, Y.; Zhao, Z.; Fu, T.; Wang, X.-Q.; Tan, W. Aptamer-Peptide Conjugates as Targeted Chemosensitizers for Breast Cancer Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *13*, 9436–9444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hamed, A.R.; Abdel-Azim, N.S.; Shams, K.A.; Hammouda, F.M. Targeting multidrug resistance in cancer by natural chemosensitizers. *Bull. Natl. Res. Cent.* **2019**, *43*, 1–14. [[CrossRef](#)]
30. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A.P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L.J.; Cibrián-Uhalte, E.; et al. The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D945. [[CrossRef](#)]
31. Perez, R.E.; Calhoun, S.; Shim, D.; Levenson, V.V.; Duan, L.; Maki, C.G. Prolyl endopeptidase inhibitor Y-29794 blocks the IRS1-AKT-mTORC1 pathway and inhibits survival and in vivo tumor growth of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2020**, *21*, 1033–1040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Modi, S.J.; Kulkarni, V.M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med. Drug Discov.* **2019**, *2*, 100009. [[CrossRef](#)]
33. Tao, K.; Fang, M.; Alroy, J.; Sahagian, G.G. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Wagle, N.S.; Jemal, A. Cancer statistics, 2023. *CA A Cancer J. Clin.* **2023**, *73*, 17–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pulaski, B.A.; Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Curr. Protoc. Immunol.* **2000**, *39*, 20.2.1–20.2.16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Li, X.; Yang, J.; Peng, L.; Sahin, A.A.; Huo, L.; Ward, K.C.; O'Regan, R.; Torres, M.A.; Meisel, J.L. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2017**, *161*, 279–287. [[CrossRef](#)]
37. Bradke, T.M.; Hall, C.; Carper, S.W.; Plopper, G.E. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhes. Migr.* **2008**, *2*, 153–160. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, F.; Feng, R.; Dai, O.; Yang, L.; Liu, Y.; Tian, Y.-C.; Peng, C.; Xiong, L. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Phenanthrene Derivatives Isolated from *Bletilla striata* on A549 Lung Cancer Cells. *Molecules* **2022**, *27*, 3519. [[CrossRef](#)]
39. Spaczyńska, E.; Mrozek-Wilczkiewicz, A.; Malarz, K.; Kos, J.; Gonec, T.; Oravec, M.; Gawecki, R.; Bak, A.; Dohanosova, J.; Kapustikova, I.; et al. Design and synthesis of anticancer 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides with a p53 independent mechanism of action. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6387. [[CrossRef](#)]
40. Lei, M.; Feng, H.; Bai, E.; Zhou, H.; Wang, J.; Qin, Y.; Zhang, H.; Wang, X.; Liu, Z.; Hai, O.; et al. Discovery of a novel dipeptidyl boronic acid proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and triple-negative breast cancer. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *17*, 683–691. [[CrossRef](#)]
41. Mohammed, E.E.; Türkel, N.; Yigit, U.M.; Dalan, A.B.; Sahin, F. Boron Derivatives Inhibit the Proliferation of Breast Cancer Cells and Affect Tumor-Specific T Cell Activity In Vitro by Distinct Mechanisms. *Biol. Trace Element Res.* **2023**. [[CrossRef](#)]
42. Borek, B.; Gajda, T.; Golebiowski, A.; Blaszczyk, R. Boronic acid-based arginase inhibitors in cancer immunotherapy. *Bioorganic Med. Chem.* **2020**, *28*, 115658. [[CrossRef](#)]
43. Husain, A.; Alam Khan, S.; Iram, F.; Iqbal, A.; Asif, M. Insights into the chemistry and therapeutic potential of furanones: A versatile pharmacophore. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *171*, 66–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Sahayarayan, J.J.; Rajan, K.S.; Vidhyavathi, R.; Nachiappan, M.; Prabhu, D.; Alfarraj, S.; Arokiyaraj, S.; Daniel, A.N. In-silico protein-ligand docking studies against the estrogen protein of breast cancer using pharmacophore based virtual screening approaches. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *28*, 400–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Solomon, V.R.; Hu, C.; Lee, H. Hybrid pharmacophore design and synthesis of isatin-benzothiazole analogs for their anti-breast cancer activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7585–7592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.