

Efectos fisiológicos y bioquímicos inducidos por las sales cuaternarias de amonio fluoradas (Scaf) y no fluoradas (Sca no f) en líneas celulares de cáncer colorrectal (CCR) con fenotipo pre-metastásico (SW948), metastásico *in situ* (SW48) y metastásico invasivo (SW620).

Autor de Tesis: Adriana Milena Olarte Aponte MSc.

Director: Sergio Andrés Pulido Muñoz MSc. Doctor en Ciencias Naturales

Codirector: Sara María Robledo Restrepo MSc. Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas.

Comité Tutorial:

Luz Amalia Ríos-Vásquez MSc. Doctora en Ciencias Químicas.

Luz Adriana Betancur-Jaramillo. Doctora en Ciencias Químicas.

Carlos Mario Muñetón Peña Biol, MSc.

Tesis presentada como requisito para obtener el título de Doctora en Ciencias Básicas Biomédicas con Énfasis en Genética

Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET

Facultad de Medicina

Universidad de Antioquia

Medellín, Colombia

Junio, 2024



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

En algún lugar algo increíble está esperando a ser descubierto

Carl Sagan Astrofísico estadounidense (1935 – 1996)

Debemos tener constancia y sobretodo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo.

Marie Salomea Sklodowska Curie Física y Química PolacaFrancesa (1867 – 1934)

Agradecimientos

A Dios, que en mi sentir, es esa fuerza que me ayudo en los momentos más oscuros e inexplicables que tuve que trasegar en este proceso, sin él, sin su fortaleza para conmigo, no lo hubiese logrado.

A la profesora Sara María Robledo Restrepo, que gracias a sus amplios y variados conocimientos en ciencias básicas además de su fortaleza, solidez, responsabilidad, ética, animo constante y perseverancia, me apoyó a lo largo de toda la investigación así como, en el desarrollo del manuscrito. Profe gracias por recibirme tan amablemente en su grupo.

A los profesores miembros del comité tutorial, quienes con sus aportes apoyaron en mejorar el manuscrito y metodologías dentro del proyecto.

A la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas (CCBB), al grupo programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) y al MetCore, por hacer nuevos grandes aportes a mi biblioteca mental de conocimientos e ideas, así, como los momentos tan agradables que viví ahí.

Al profesor Mauricio Rojas por su integridad y profundidad científica.

A mi red de apoyo, que llevo en el corazón, gracias por hacer los momentos de pandemia más llevaderos, por forjar una amistad tan bonita, con tantos sueños y metas por cumplir, y lugares por conocer.

A mis amigos, los que he tenido siempre, los que hice en Medellín y los que tengo ahora, a todos ellos que pusieron un granito de arena para darme esa voz de aliento y esa buena vibra que jamás faltó para mí de su parte, los quiero.

A Eliana y a Jazmín hermosas mujeres forjadoras de ciencia desde su más pura esencia, gracias por sus grandes aportes y apoyo para mí en este proceso.

A Santiago por su apoyo emocional para dar esa “milla extra”. Gracias.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a las mujeres de mi casa, mi hija quien es el motor de mi vida desde antes de nacer, mi mamá una mujer que vale oro, gigante en valores y amor por todos sus hijos, mis hermanas, por su fortaleza, perseverancia y amor hacia sus proyectos y los demás, mis abuelas que, aunque ya no están en este plano siempre vivirán en mi corazón y me están acompañando hoy y siempre.

A mi papi, un hombre que me ha enseñado que la responsabilidad, perseverancia, constancia y honestidad son las más bellas formas de demostrar amor.

Gracias a tod@s...

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad características heterogéneas y de origen multifactorial que involucran alteraciones genéticas y la consecuente modulación de rutas metabólicas específicas. Esta patología se sitúa como el tercer tipo de cáncer más prevalente y la segunda con la mayor tasa de mortalidad en el mundo. Las alternativas terapéuticas para el tratamiento del CCR se basan en el uso de terapias sistémicas mediante la administración de quimioterapia, terapia biológica o inmunoterapia; sin embargo, estas intervenciones presentan algunas desventajas, tales como la alta toxicidad, altos costos, uso de infraestructura de alta complejidad, ocurrencia de complicaciones post operatorias y efectos secundarios adversos al uso de fármacos quimioterapéuticos. Por estas razones, se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas ya sea con nuevas entidades químicas que sean capaces de inducir la muerte de células tumorales idealmente de manera específica. Las sales cuaternarias de amonio fluoradas (SCAF) son un grupo de moléculas que pertenecen al grupo de los líquidos iónicos muy utilizados en la industria farmacéutica ya que tienen diversas propiedades biológicas incluyendo la actividad antitumoral, dado a que poseen un catión de amonio cuaternario y algunas poseen colas hidrofóbicas que permiten generar eventos citotóxicos.

El presente trabajo tuvo como objetivo elucidar los efectos fisiológicos y bioquímicos inducidos por las SCAF y SCA no fluoradas (SCA no F) en líneas celulares de CCR con fenotipo pre-metastásico (SW948), metastásico *in situ* (SW48) y metastásico invasivo (SW620).

Para las diferentes líneas celulares inicialmente se realizó una búsqueda en bases de datos y la literatura acerca de sus características genéticas y epigenéticas, además, un análisis *in silico* de las características fisicoquímicas y farmacológicas de 14 SCA y dos SCA no F. Luego se evaluó el efecto de estas sales en la viabilidad celular y para las SCAF **5**, **11** y **13**, como también, el efecto en la inducción de muerte celular según la ocurrencia de la fragmentación del ADN, alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la exposición de fosfatidil serina en la membrana celular. Por último, mediante un análisis de metabolómica no dirigida se evaluó la capacidad de las SCAF **11** y **13** para alterar metabolitos energéticos, ácidos grasos, fosfolípidos ubicados en la membrana celular, envueltos en la dinámica de la bicapa lipídica y a nivel citoplásmico, así como aminoácidos, que regulan procesos de supervivencia celular en el metaboloma de la línea celular de CCR con fenotipo metastásico invasivo (SW620).

Los resultados obtenidos sugieren que las SCAFs tiene un mayor potencial citotóxico en relación con las SCA no F en células derivadas de CCR, fibroblastos de piel Detroit 551, PMBCs y tejido colorrectal murino; las SCAF **5**, **11** y **13** generan además, cambios en el ciclo celular de células de CCR en diferentes estadios alterando el potencial de membrana mitocondrial y sugiriendo un fenotipo de muerte probablemente por apoptosis o necrosis. Por último, las SCAF **11** y **13** posiblemente tienen la capacidad para alterar metabolitos en vías bioquímicas tales como: i) la biosíntesis de pantotenato y CoA; ii) tirosina; iii) los metabolismos de pirimidinas; iv) taurina e hipotaurina; v) N-Glicanos; vi) valina, leucina e isoleucina; vii) glutatión; viii) ácidos biliares primarios; y ix) metabolismo de amino azúcar y azúcares en nucleótidos. Todas estas vías regulan procesos de supervivencia celular en el metaboloma celular.

En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que las SCAF **11** y **13**, podrían ser unos candidatos para el desarrollo de alternativas terapéuticas en el tratamiento del CCR.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, citotoxicidad, ciclo celular, propiedades fisicoquímicas, metaboloma, biomarcadores.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a disease of multifactorial origin that involves genetic alterations and the consequent modulation of specific metabolic pathways. This pathology is the third most prevalent type of cancer and the second with the highest mortality rate in the world. Therapeutic alternatives for the treatment of CRC are based on the use of systemic therapies through the administration of chemotherapy, biological therapy or immunotherapy; However, these interventions present some disadvantages, such as high toxicity, high costs, use of highly complex infrastructure, occurrence of postoperative complications and adverse side effects from the use of chemotherapeutic drugs. For these reasons, it is necessary to search for new therapeutic alternatives, with new chemical entities that are capable of inducing the death of tumor cells, ideally in a specific manner. Fluorinated quaternary ammonium salts (SCAF) are a group of molecules that belong to the group of ionic liquids widely used in the pharmaceutical industry since they have various biological properties including antitumor activity, given that they have a quaternary ammonium cation and some have hydrophobic tails that allow them to generate cytotoxic events.

The objective of this work was to elucidate the physiological and biochemical effects induced by SCAF and non-fluorinated SCA (non-F SCA) in CRC cell lines with pre-metastatic (SW948), in situ metastatic (SW48) and invasive metastatic (SW620) phenotypes.

For the different cell lines, a search was initially carried out in databases and the literature about their genetic and epigenetic characteristics, in addition, an *in silico* analysis of the physicochemical and pharmacological characteristics of 14 SCA and two non-F SCA. The effect of these salts on cell viability for SCAF 5, 11 and 13, as well as the effect on the induction of cell death according to the occurrence of DNA fragmentation, alterations in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and the exposure of phosphatidyl serine in the cell membrane. Finally, through a non-targeted metabolomics analysis, the ability of SCAFs 11 and 13 to alter energy metabolites, fatty acids, phospholipids located in the cell membrane, involved in the dynamics of the lipid bilayer and at the cytoplasmic level, as well as amino acids, was evaluated. , which regulate cell survival processes in the metabolome of the CRC cell line with invasive metastatic phenotype (SW620).

The results obtained suggest that SCAFs have a greater cytotoxic potential in relation to non-F SCAs in cells derived from CRC, Detroit 551 skin fibroblasts, PMBCs and murine colorectal tissue; SCAF 5, 11 and 13 also generate changes in the cell cycle of CRC cells in different stages, altering the mitochondrial membrane potential and suggesting death by apoptosis. Finally, SCAFs 11 and 13

possibly have the capacity to alter metabolites in biochemical pathways such as: i) pantothenate and CoA biosynthesis; ii) tyrosine; iii) pyrimidine metabolisms; iv) taurine and hypotaurine; v) N-Glycans; vi) valine, leucine and isoleucine; vii) glutathione; viii) primary bile acids; and ix) metabolism of amino sugar and sugars into nucleotides. All of these pathways regulate cell survival processes in the cellular metabolome.

In conclusion, the results of the present work suggest that SCAF **11** and **13** could be candidates for the development of therapeutic alternatives in the treatment of CRC.

Keywords: Colorectal cancer, cytotoxicity, cell cycle, physicochemical properties, metabolome, biomarkers.

Tabla de contenido

Contenido

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| Introducción | 16 |
| 1. Marco teórico..... | 16 |
| 1.1 Generalidades del CCR | 16 |
| 1.2 CCR como problema de salud pública global y nacional | 18 |
| 1.3 Vías de señalización, alteraciones genéticas y epigenéticas del CCR y su asociación con los estadios de la enfermedad. | 21 |
| 1.4 La epigenética en el CCR..... | 29 |
| 1.5 Estadios del CCR..... | 31 |
| 1.6 Sales cuaternarias de amonio y el CCR..... | 32 |
| 1.6.1 Actividad biológica de algunas SCA | 35 |
| 1.6.2 Estructura química de las SCA fluoradas y no fluoradas | 36 |
| 1.6.3 Influencia biológica del grupo difenil-vinilo en la estructura de variadas moléculas farmacéuticas | 37 |
| 1.6.4 Flúor y grupo CF₃ interesantes sustituyentes orgánicos en moléculas de interés biológico. | 41 |
| 1.7 Metabolómica y el estudio de perfiles metabolómicos en CCR | 42 |
| 1.7.1 Herramientas utilizadas para el estudio del metaboloma | 43 |
| 2. Antecedentes | 44 |
| 3. Planteamiento del problema..... | 47 |
| 4. Justificación | 48 |
| 5. Preguntas de investigación | 50 |
| 5. Objetivos..... | 50 |
| 5.1 Objetivo General | 50 |
| 5.2 Objetivos Específicos | 50 |
| 6. Materiales y métodos..... | 51 |
| 6.1 Síntesis de SCAF y SCA no F | 51 |
| 6.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo | 52 |
| 6.3 Consulta bibliografía en relación a las líneas celulares de CCR | 53 |
| 6.4 Análisis <i>in silico</i> de las propiedades fisicoquímicas y farmacología de las SCAFs y SCAs no F | 54 |
| 6.5 Evaluación <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> de la citotoxicidad de las SCAFs y SCAs no F | 54 |

| | |
|--|-----|
| 6.6 Efecto de las SCAF 5, 11 y 13 en sobre el ciclo celular, fragmentación del ADN, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e integridad de la membrana plasmática | 56 |
| 6.7 Análisis estadístico para ensayos de citotoxicidad, viabilidad celular, ciclo celular e integridad de la membrana celular | 59 |
| 6.8 Análisis metabolómicos en líneas celulares de CCR SW620 | 59 |
| 6.8.1 Cultivo y tratamiento de las células SW620 con las SCAF 11 y 13..... | 60 |
| 6.8.2 Quenching y extracción de metabolitos..... | 60 |
| 6.8.3 Análisis de metabolómica no dirigida | 61 |
| 6.8.3.1 Preparación de los controles de calidad (CC o QC)..... | 61 |
| 6.8.3.2 Metabolomica no dirigida por RP-LC/ -QTOF-MS..... | 62 |
| 6.8.3.3 Metabolómica no dirigida por HILIC-LC-MS | 63 |
| 6.8.3.4 Procesamiento y análisis de datos..... | 63 |
| 6.8.3.5 identificación de metabolitos estadísticamente significativos e interpretación biológica de los resultados..... | 65 |
| 7. Resultados..... | 66 |
| 7.1 Análisis bioinformático y bibliográfico de los cambios genéticos presentes en las células de CCR | 66 |
| 7.2 Análisis bioinformático de las líneas celulares de CCR | 70 |
| 7.3 Citotoxicidad de SCAF y SCA no F..... | 70 |
| 7.4 Efectos inducidos por las SCAFs 5 (C_5ClmCF_3), 11 (C_6ImCF_3) y 13 (C_6IpCF_3) sobre el ciclo celular y fragmentación del ADN, $\Delta\Psi_m$ e integridad de la membrana plasmática..... | 81 |
| 7.5 Análisis <i>in silico</i> de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las SCAFs y SCA no F... .. | 92 |
| 7.6 Referenciación de metabolitos anotados mediante analisis multiplataforma | 97 |
| 7.7 Controles de calidad y pretratamiento en los análisis metabolómicos de células SW620 expuestas a las SCAF 11 y 13 | 116 |
| 7.7 Pretratamiento UHPLC-HILIC (-), UHPLC- RP-ESI (-) y UHPLC- RP-ESI (+)..... | 117 |
| 7.8 Análisis multivariado de los grupos del ensayo | 118 |
| 7.8.1 OPLS-DA de UHPLC-HILIC (-) para la comparación entre células SW620 no tratadas (G6) y las células SW620 tratadas con la SCAF 11 (G7)..... | 118 |
| 7.8.3 OPLS-DA de UHPLC-HILIC (-) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8). | 122 |
| 7.8.5 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (-) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 13 (G8)..... | 126 |
| 7.8.6 OPLS-DA de UHPLC- RP-ESI (-) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8)..... | 128 |
| 7.8.6 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 11 (G7)..... | 130 |

| | |
|---|-----|
| 7.8.7 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 13 (G8)..... | 132 |
| 7.8.8 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8)..... | 134 |
| 7.9.2 Análisis de enriquecimiento | 142 |
| 8. Discusión..... | 148 |
| 9. Conclusiones..... | 169 |
| 9.1 Conclusión general:..... | 169 |
| 9.2 Conclusiones específicas:..... | 170 |
| 10. Perspectivas y Direcciones Futuras del Trabajo | 172 |
| 11. Bibliografía | 174 |
| Anexo 1. Pruebas piloto: estandarización de condiciones óptimas para los análisis metabolómicos definitivos | 188 |
| Anexo 2. Condiciones del análisis RP-LC/MS-QTOF (+)..... | 198 |
| Anexo 3. Condiciones del análisis HILIC-LC/MS-QTOF (-)..... | 199 |
| | 200 |

Lista de figuras

Figura 1. Distribución en porcentaje de la incidencia (A) y muerte (B) de las neoplasias diagnosticados mayoritariamente en el mundo.

Figura 2. Distribución en porcentaje de la incidencia (A) y muerte (B) en Colombia del CCR..

Figura 3. Principales vías moleculares en la patogenia del cáncer colorrectal.

Figura 4. Esquema general de las vías de inestabilidad genética y epigenética que impulsan la aparición y el desarrollo del cáncer colorrectal

Figura 5. Vía supresora CIN, mutadora MSI y secuencia adenoma-carcinoma.

Figura 6. Estructura del catión de Nitrógeno cuaternario

Figura 7. Estructura de la molécula de colina

Figura 8. Estructura general de las sales de amonio cuaternarias no fluoradas y fluoradas.

Figura 9. Estructura química del grupo difenil vinilo terminal.

Figura 10. Estructura química de compuestos con grupo difenil vinilo.

Figura 11. Esquema general de un análisis de espectrometría de masas acoplado a un equipo de UHPLC.

Figura 12. Cuadro de dialogo de los resultados que se pueden derivar del ensayo de evaluación de la integridad de la membrana plasmática y potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Figura 13. Cuadro de dialogo de los resultados que se pueden derivar del ensayo de evaluación de la exposición de fosfatidil serina en la membrana plasmática y evaluación de la muerte por apoptosis.

Figura 14. Modelo gráfico de la progresión tumoral y mutaciones observadas en cada línea celular.

Figura 15. Relación de la citotoxicidad y el efecto citopático de SCAF y SCA no F.

Figura 16. Gráficas del índice de selectividad frente a las células sanas vs células de CCR.

Figura 17. Gráficas del índice de selectividad para células pre-metastásicas SW948 vs. metastásicas SW48 y SW620.

Figura 18. Detención del ciclo celular y fragmentación del ADN de diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal contra la inducción de las SCAF **5**, **11** y **13**.

Figura 19. Integridad de la membrana plasmática en líneas celulares de cáncer colorrectal SW48, SW620 y SW948 frente a fibroblastos Detroit 551 normales tratados con SCAF **5**, **11** y **13**.

Figura 20. Exposición de fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática de líneas celulares de cáncer colorrectal SW48, SW620 y SW948 vs fibroblastos Detroit 551 tratadas con las SCAFs **5**, **11** y **13**.

Figura 21. Análisis de componentes principales para la comparación entre grupos

Figura 22. Pretratamiento de los datos - diagrama de cajas y bigotes.

Figura 23. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-).

Figura 24. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G6.

Figura 25. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-).

Figura 26. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G8 vs G6.

Figura 27. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-).

Figura 28. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G8.

Figura 29. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-).

Figura 30. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G6.

Figura 31. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-).

Figura 32. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G8 vs G6.

Figura 33. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-).

Figura 34. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G8.

Figura 35. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+).

Figura 36. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G6.

Figura 37. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+).

Figura 38. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G8 vs G6..

Figura 39. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+).

Figura 40. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G8.

Figura 41. Impacto de las rutas de los metabolitos alterados en las vías metabólicas en células SW620 tratadas con SCAF 11 y detectados por metabolómica.

Figura 42. Impacto de las rutas de los metabolitos alterados en las vias metabolicas en células SW620 tratadas con SCAF **13** y detectados por metabolómica.

Figura 43. Diagrama de Venn en donde se relacionan las vias metabólicas afectadas por SCAF **11** y SCAF **13**.

Figura 44. Vías metabólicas obtenidas por los análisis de descripción general de los conjuntos de metabolitos enriquecidos con G7.

Figura 45. Vías metabólicas obtenidas por los análisis de descripción general de los conjuntos de metabolitos enriquecidos con G8.

Figura 46 Diagrama de Venn en donde se relacionan las vias metabólicas afectadas por SCAF **11** y SCAF **13**.

Figura 47. Diagrama de Venn en donde se relacionan las vias metabólicas afectadas por SCAF **11** y SCAF **13**.

Figura 48. Posible mecanismo de acción citotóxica de las SCAFs **11** y **13** en células SW620.

Lista de tablas

Tabla 1. Alteraciones genéticas y epigenéticas en CCR.

Tabla 2. Códigos, formulas IUPAC y masa molar de las SCA F y no F sintetizadas en el estudio.

Tabla 3. Alteraciones genéticas de las líneas celulares de cáncer colorrectal SW948, SW48 y SW620.

Tabla 4. Relación de MSI y estado de CIMP y CIN en las líneas celulares SW48, SW620 y SW948.

Tabla 5. Citotoxicidad y efecto citopático de SCAF y SCA no F.

Tabla 6. Índices de selectividad para SCAF y SCA no F para células sanas vs. células de cancer colorectal.

Tabla 7. Selectividad de las SCAF para celulas pre-metastásicas SW948 vs. metastásicas *in situ* SW48 y metastásicas invasivas SW620.

Tabla 8. Relación sub-G1/G1 para líneas celulares de cáncer colorectal (SW948, SW48 y SW620) y fibroblastos (Detroit 551).

Tabla 9. Análisis *in silico* de parámetros fisicoquímicos y farmacológicos de las SCAF y SCA no F.

Tabla 10. Referenciación de metabolitos encontrados en el análisis de comparaciones entre las SCAFs y células SW620.

Tabla 11. Análisis de vías metabólicas asociadas al efecto de SCAF **11**.

Tabla 12. Análisis de vías metabólicas asociadas al efecto de SCAF **13**.

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad que afecta el colon y el recto y constituye una de las tasas más altas de mortalidad por cáncer en la última década en el mundo occidental (Cancer; world health organizer; international agency for reseacrh on cancer, 2018). Se han realizado avances con relación al tratamiento dependiendo de la fase clínica del paciente y de su condición de salud, con el objetivo de mejorar la supervivencia y la calidad de vida de estos. Entre estas alternativas terapéuticas se encuentran: la radioterapia, resección quirúrgica, la bioterapia y la quimioterapia (Billiau, 2016).

Las sales cuaternarias de amonio (SCA) guardan relación estructural con los líquidos iónicos (LIs) pero además también tienen propiedades antitumorales para células de cáncer de cuello y cabeza como lo son el bromuro de cetrimonio (Ito et al., 2009) y el cloruro de benzetonio (Yip et al., 2006).

En el presente trabajo se sintetizaron SCA fluoradas (SCAF) de fórmula $[X-CH_2N(CH_3)_2(CH_2)_nCH=C(Ar)_2]^+ I^-$ (en las que X=H, Cl o I; n=3 o 4; Ar=Ph, *p*-F-Ph, *m*-F-Ph, *m*-CF₃-Ph o *p*-CF₃-Ph), que son sales cuaternarias con presencia de grupo difenilvinilo terminal. Específicamente se evaluó el potencial de las SCAF como posibles agentes antitumorales en células de tres líneas de CCR con diferente fenotipo: pre-metastásico (células SW948), metastásica *in situ* (SW48) y metastásico invasivo (SW620). Bajo diferentes contextos genéticos y epigenéticos, se estimó la concentración citotóxica media (CC₅₀) y las alteraciones metabólicas de las rutas biosintéticas involucradas en la citotoxicidad inducidas por las SCAF más citotóxicas en cada una de las tres líneas celulares de CCR evaluadas, como una aproximación al entendimiento del mecanismo de acción y posibles rutas metabólicas blanco.

1. Marco teórico

1.1 Generalidades del CCR

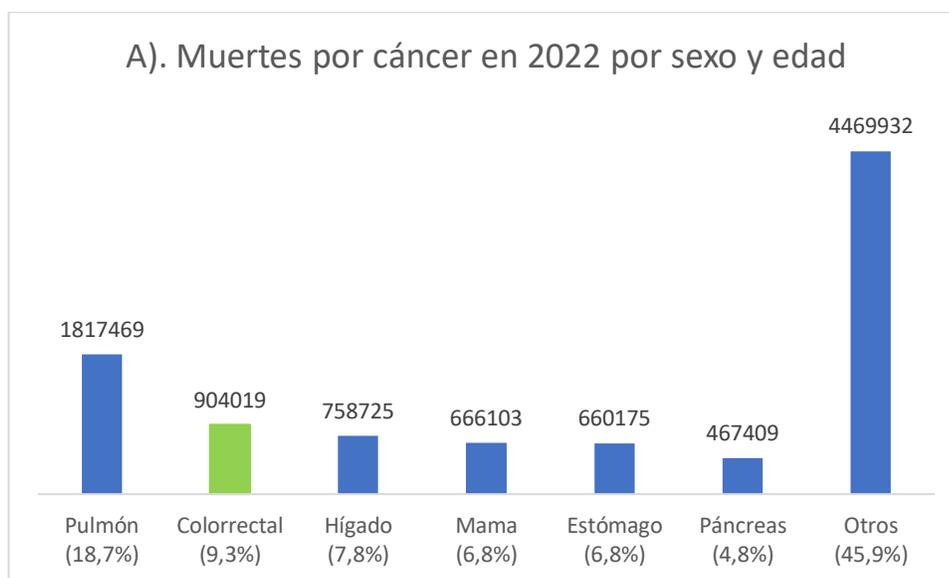
El CCR es una enfermedad causada por mutaciones somáticas de origen genético, con características moleculares heterogéneas, de origen multifactorial inducida por diversas alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumor que están involucrados en vías de reparación y proliferación celular, y

debido a estos cambios, no tienen la posibilidad de ejercer de manera correcta su papel, verificando y eliminando errores generados durante la promoción del ciclo celular. Múltiples alteraciones genéticas como mutaciones, anomalías cromosómicas y cambios epigenéticos inducen el desarrollo del CCR; dichas alteraciones promueven la transformación de la mucosa normal del colon hacia un póliplo benigno, el cual podría evolucionar hacia adenoma temprano y dado un acúmulo de alteraciones genéticas y epigenéticas este progresa luego hacia adenoma avanzado o tardío y finalmente hacia carcinoma (Fearon & Vogelstein, 1990a; Muñeton Peña, 2008; Rúa & Peña, 2012).

Esta patología puede presentarse por predisposición genética (susceptibilidad heredada) o por eventos esporádicos, aunque la mayoría de los casos ocurre en ausencia de antecedentes familiares. Aproximadamente el 75 al 80% de los casos de CCR no poseen una historia familiar aparente ni una predisposición genética; los casos restantes son consecuencia de una susceptibilidad heredada, moderadamente penetrante en la que posiblemente interactúan con factores ambientales, como lo es la enfermedad intestinal inflamatoria crónica, la poliposis adenomatosa familiar o (FAP) y síndrome de Lynch (Nguyen et al., 2018). Los factores de riesgo del CCR se asocian con las alteraciones genéticas y epigenéticas que se acumulan y conllevan al desarrollo de la enfermedad, pero también con alteraciones derivadas o asociadas los factores del medio ambiente y la dieta (Inamura, 2018). Sin embargo, la mayoría de los casos ocurre en ausencia de antecedentes familiares a lo cual se le denomina de inicio esporádico, que según la hipótesis de Knudson de los dos golpes el origen del cáncer de manera tanto heredada como esporádica es causado por dos eventos mutacionales, en forma de herencia dominante, una mutación se hereda a través de las células germinales y la segunda ocurre en las células somáticas. En la forma no hereditaria, ambas mutaciones ocurren en las células somáticas (Knudson, 1971); así en el CCR de origen esporádico se requieren mutaciones en al menos cuatro o cinco genes y adicionalmente alteración de factores epigenéticos para la formación de un tumor maligno. Por último, aunque las alteraciones genéticas a menudo ocurren según una secuencia preferida, la acumulación total de cambios, más que su orden entre sí, es responsable de determinar las propiedades biológicas del tumor (Fearon & Vogelstein, 1990b).

1.2 CCR como problema de salud pública global y nacional

El CCR es un problema de salud pública debido a la alta morbimortalidad. Ocupa el tercer lugar a nivel mundial en términos de incidencia, sin embargo el segundo en términos de mortalidad. Los datos indicaron que en 2022 se produjeron más de 1,9 millones de nuevos casos de cáncer colorrectal (incluidos los cánceres anales); en relación a la prevalencia entre 1 a 5 años desde 2022 se estima que podrían llegar hasta los 5.253.335 de casos nuevos; con relación a los datos publicados por muerte esta patología ocupa el segundo lugar con respecto a muerte por cáncer en el mundo, presentando 904.019 casos en el año 2022 (Organization, 2022; The Global Cancer Observatory, 2022). El CCR es además la tercera causa de muerte por cáncer sólido después del cáncer de pulmón y de hígado (en los hombres) y del cáncer de mama y de pulmón (en las mujeres) (Pardo & Cendales, 2015). Los valores consolidados de incidencia y prevalencia en el mundo se pueden observar en la (Figura 1).



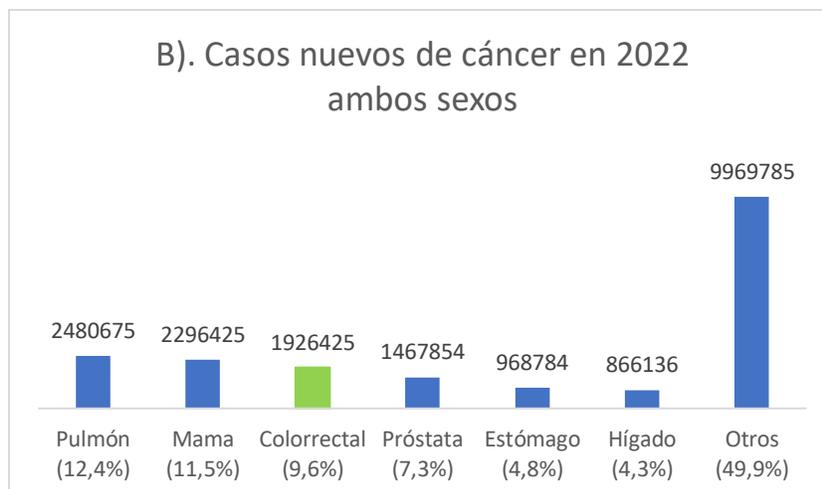
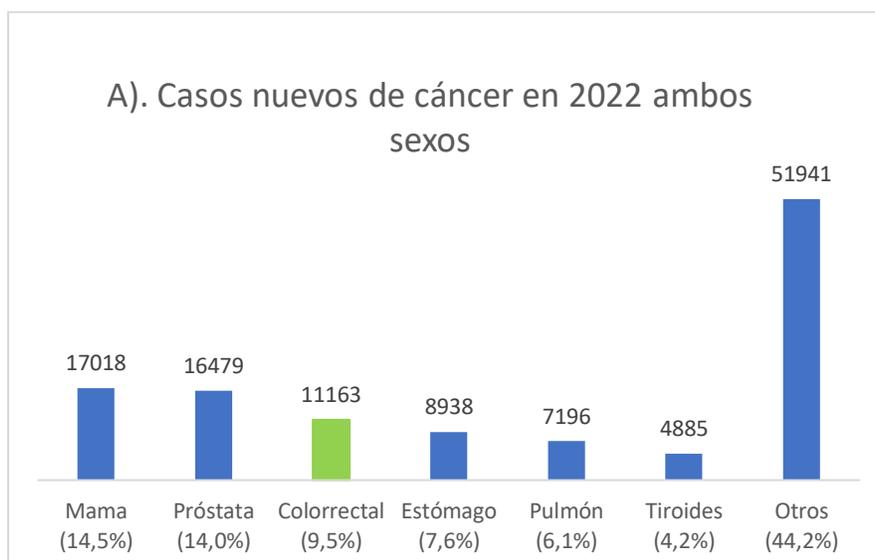


Figura 1. Distribución en porcentaje de la Muerte (A) y incidencia (B) de las neoplasias diagnosticados mayoritariamente en el mundo. Modificado de The Global Cancer Observatory, 2022. Se destaca en verde los datos para CCR.

En Colombia el CCR se ubica en el tercer lugar después del cáncer de mama y próstata, con una incidencia del 9,5% y 11.163 casos y es uno de los 5 tipos de cáncer más diagnosticados en Colombia (Figura 2) (The Global Cancer Observatory, 2022). Se estima una prevalencia a 5 años de 18.654 nuevos casos (Bravo & Muñoz, 2018; The Global Cancer Observatory, 2022).



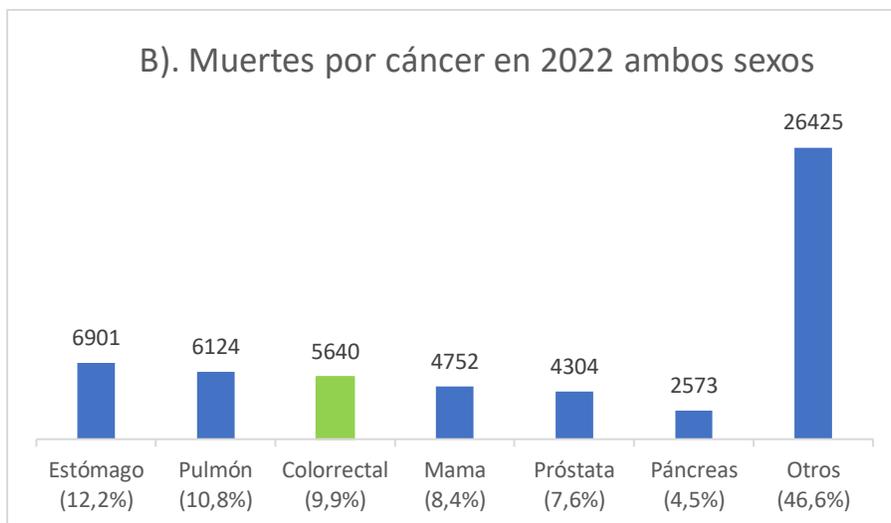


Figura 2. Distribución en porcentaje de la incidencia (A) y muerte (B) en Colombia del CCR. Datos tomados de (The Global Cancer Observatory, 2021).

El CCR es una enfermedad crónica multifactorial cuyos factores de riesgo incluyen: tabaquismo, edad avanzada (> 57 años), alto consumo de alcohol, índice de masa corporal (IMC) mayor a 21, síndrome metabólico X (corresponde a una serie de factores que generan riesgo de enfermedad cardiaca, diabetes y otros problemas de salud), una dieta elevada en el consumo sodio, grasas saturadas y tipo trans, carnes rojas y procesadas, y bajo consumo de hortalizas, fibra y calcio, el uso de antiinflamatorios no esteroideos, inactividad física y los altos niveles de estrés (Wolf et al., 2018).

También cuentan factores de riesgos genéticos y ambientales como la existencia de enfermedad inflamatoria intestinal, pólipos intestinales y la predisposición genética. Cabe destacar que una cuarta parte de los pacientes diagnosticados de CCR tienen algún familiar afectado y en el 15% de todos los casos existe un componente hereditario (Vacas, 2023). Aproximadamente el 75 - 80% de los casos de CCR son esporádicos sin antecedentes familiares o predisposición genética aparente (Nguyen et al., 2018) y la mayoría de los diagnósticos se dictaminan en estados avanzados de la enfermedad (Afanador Ayala & Muñetón Peña, 2018).

1.3 Vías de señalización, alteraciones genéticas y epigenéticas del CCR y su asociación con los estadios de la enfermedad.

El CCR es una enfermedad multifactorial y genéticamente heterogénea que se caracteriza por un rango de alteraciones genéticas y epigenéticas (Goel & Boland, 2012). Dichos desordenes afectan la expresión de múltiples genes, promoviendo la transformación de la mucosa normal del colon hacia un pólipo benigno, el cual progresa hacia adenoma temprano, luego intermedio, hasta avanzar a un adenocarcinoma de colon (Goel & Boland, 2012).

El 15-20% de los casos son de tipo hereditario y presentan un patrón de herencia autosómico dominante con una moderada penetrancia y puede estar influido además por factores ambientales (Burt, 2007; Hendon & DiPalma, 2005; Li, 2018; Nguyen et al., 2018). Mutaciones germinales en los genes *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) están involucrados en el desarrollo del CCR de tipo hereditario generando la poliposis adenomatosa familiar FAP (Familial Adenomatous Polyposis), en donde menos del 1% de individuos que provengan de familias con esta condición pueden heredarla al obtener una copia del gen *APC* mutado. La manifestación fenotípica se caracteriza por la presencia de pólipos adenomatosos en el intestino (Afanador et al., 2022; Li, 2018; Lynch et al., 2015; Nguyen et al., 2018; Pavicic et al., 2014). En tanto, las mutaciones en los promotores de los genes del sistema reparador de bases mal apareadas (MMR, del inglés Mismatch Repair) *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se encuentran asociadas al CCR no polipósico (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cáncer) (HNPCC) o síndrome de Lynch, que se caracteriza por una inestabilidad microsatelital dado por un defecto en el sistema de reparación del ADN en la vía MMR, en el cual los genes *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*, presentan mutaciones funcionando de manera incorrecta durante los procesos de replicación y transcripción de genes y traducción de proteínas (Fearon & Vogelstein, 1990; Li, 2018; Nguyen et al., 2018).

Existe otra forma hereditaria que corresponde al síndrome pólipos de Hartomatous el cual es una enfermedad genética rara y que puede ser heredada comúnmente con una baja penetrancia, con menos del 1% de los individuos que provienen de familias con esta alteración genética (Nguyen et al., 2018; Nguyen & Weinberg, 2016a). También el síndrome de Peutz-Jegher con poliopsis adenomatosa ligera del colon y CCR de Burt en donde se presenta una mutación en el gen *STK11* (Clarens, 2004).

En relación con las bases moleculares que originan el CCR de tipo esporádico se encuentra en primer lugar la vía celular de inestabilidad cromosómica (CIN, del inglés Chromosomal Inestability). Se estima que el promedio de mutaciones de una célula humana normal está en el orden de $2,5 \times 10^{-8}$ mutaciones/nucleótido/generación (Fearon & Vogelstein, 1990a; Jass, 2007; Pavicic et al., 2014); pero este valor se incrementa en células cancerosas debido a la acumulación de múltiples mutaciones durante la división celular generando el llamado “fenotipo mutador” (Markowitz & Bertagnolli, 2009; Vacas, 2023). Esta irregularidad permite que existan ganancias o pérdidas de altas cantidades de material genético y conlleva a que se produzcan errores que se evidencian en análisis citogenéticos como aneuploidias, rearrreglos cromosómicos, deleciones, amplificaciones sub-cariotípicas; también se presenta la alta tasa de LOH (por sus siglas en inglés, *loss of heterozygosity*) en los loci de los genes supresores tumorales (Migliore et al., 2011; Burt, 2007; Goel & Boland, 2012), además de la inestabilidad microsatelital (MSI (del inglés Microsatellite instability) y la alta metilación de islas CpG (Vogelstein et al., 1988) (Figura 3).

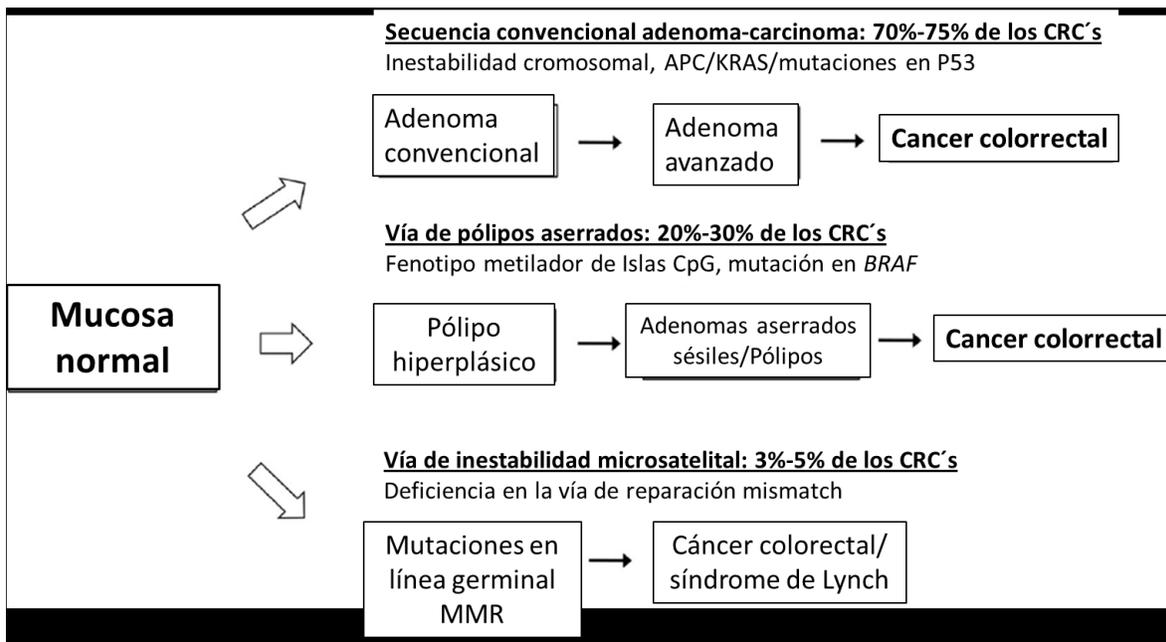


Figura 3. Principales vías moleculares en la patogénesis del cáncer colorrectal. CCR: cáncer colorrectal; MMR: reparación de desajustes Miss Match Repair. Adaptado de Migliore et al., 2011.

Con relación a la vía CIN se han observado mutaciones genéticas en diversos genes como el caso del gen *KRAS*, un proto-oncogen con actividad GTP-asa que pertenece a la familia de oncogenes

RAS; *KRAS* presenta mutaciones que han sido encontradas en los codones 12 y 13 dentro del exón 2 entre un 35% y el 45% de casos con CCR, siendo los puntos más frecuentes de estas mutaciones (casi el 95% de todas las mutaciones) (Aldecoa, 2020), le sigue *B-RAF* proto-oncogen con actividad serin/treonin kinasa con la mutación V600E, que se encuentra en alrededor de 10 % de los cánceres metastáticos colorrectales y se asocia a desenlaces particularmente desfavorables para los pacientes con CCR. Entretando el gen *APC* supresor tumoral con una mutación sin sentido el codón 1628 y que debido a esta mutación se genera una proteína truncada en el extremo carboxi-terminal responsable de las funciones relacionadas con la CIN pero retiene la región de regulación dependiente de β -catenina (Cabrera & López-Nevot, 2005; Fodde et al., 2001) y por último *TP53* gen supresor tumoral, las variadas mutaciones de p53 en el CCR ocurren en el 34% de los tumores de colon proximal y en el 45% de los tumores colorrectales distales (Armaghany et al., 2012; World Health Organization; International Agency for Reseach on cancer, 2018). La mayoría de estas mutaciones se presentan en los exones 5 a 8 (dominio de unión al ADN), y principalmente en algunos codones de puntos críticos, como 175, 245, 248, 273 y 282, que comprenden la transición de G a A, de C a T y que conducen a la sustitución de un aminoácido único en la proteína p53 (Liu et al., 2021; Weinstein et al., 2013).

Todos los genes descritos anteriormente están implicados en el desarrollo clásico de la carcinogénesis colorrectal donde se sigue los múltiples pasos propuestos por Fearon y Vogelstein en 1990; según este modelo se inicia con una inactivación de *APC* que como primer evento, se da la generación de adenomas, es en esta fase que se presenta las mutaciones oncogénicas en *KRAS* y eventualmente la delección de la región q del cromosoma 18 considerado esto como un marcador de mal pronóstico debido a que hay pérdida de secuencias que genera a *SMAD* y *DCC* supresores tumorales importantes en el modelo de CCR y que están ubicados en la región 18q21.2; seguido a esto, se promueve la inactivación del gen *TP53* en el cromosoma 17p que ocurre para dar paso a la malignidad del adenoma tardío a carcinoma. (Fearon & Vogelstein, 1990a; Migliore et al., 2011). Se cree que las mutaciones de este gen desempeñan un papel fundamental en la transición adenoma-carcinoma durante el proceso patológico tumoral (Mármol et al., 2017).

El modelo clásico del patrón de carcinogénesis con múltiples pasos en la progresión del adenoma hacia el carcinoma, que explica el desarrollo del CCR de origen esporádico fue propuesto por Fearon y Vogelstein en la década de los 90 al que denominaron vía tradicional o supresora o del carcinoma-

adenomatoso, explica la carcinogénesis basado en la inactivación de genes supresores tumorales *APC*, *TP53* y *DCC*, y mutaciones en los oncogenes *KRAS*, *BRAF* y *SMAD*. (Fearon & Vogelstein, 1990a) que conducen a CIN, y que conllevan a la desregulación de las vías de reparación, apoptosis, crecimiento y diferenciación apoyando la carcinogénesis (Figura 3).

En el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein se observa la acumulación progresiva de aberraciones genéticas y epigenéticas de las células que se están transformando. Dentro de esta evolución que se da de adenoma a carcinoma se encuentran principalmente la inestabilidad microsatelital (MSI), contando del 15 al 20% de los casos de CRC esporádico; CIN, alrededor del 80 al 85% de los casos en lo que se presentan ganancias o pérdidas de cromosomas regiones o brazos completos, arreglos cromosomales lo que genera LOH y resulta además en variaciones de números de copias (CNV's) (Asante et al., 2019; Goel & Boland, 2012) además del fenotipo metilador de islas CpG (Fearon & Vogelstein, 1990a; Nguyen et al., 2018). Todas estas alteraciones influyen en que los genes que están asociados al control y correcta progresión del ciclo celular se vean afectados de manera negativa; activando vías de señalización celular a favor de la tumorigénesis, que se evidencia cuando hay una progresión del adenoma benigno hasta el adenocarcinoma, evento que se caracteriza por su dinámica invasiva y metastásica; esta evolución puede tardar décadas pasando desapercibido escapando del control de la regulación que tienen las células (Figura 3) (Migliore et al., 2011; Pavicic et al., 2014; Seguí et al., 2014).

La segunda vía se denomina mutadora y se relaciona con mutaciones en los genes del sistema de reparación MMR, principalmente *MLH1* y *MSH2*, que inducen MSI en las células tumorales (Fearon & Vogelstein, 1990a). Incluye un grupo de alteraciones moleculares en el espectro de la carcinogénesis, ocurre del 15 al 20% de los tumores generados por cáncer de tipo esporádico y en un 95% de los HNPCC (Hendon & DiPalma, 2005; Li, 2018) (Figuras 3 y 4).

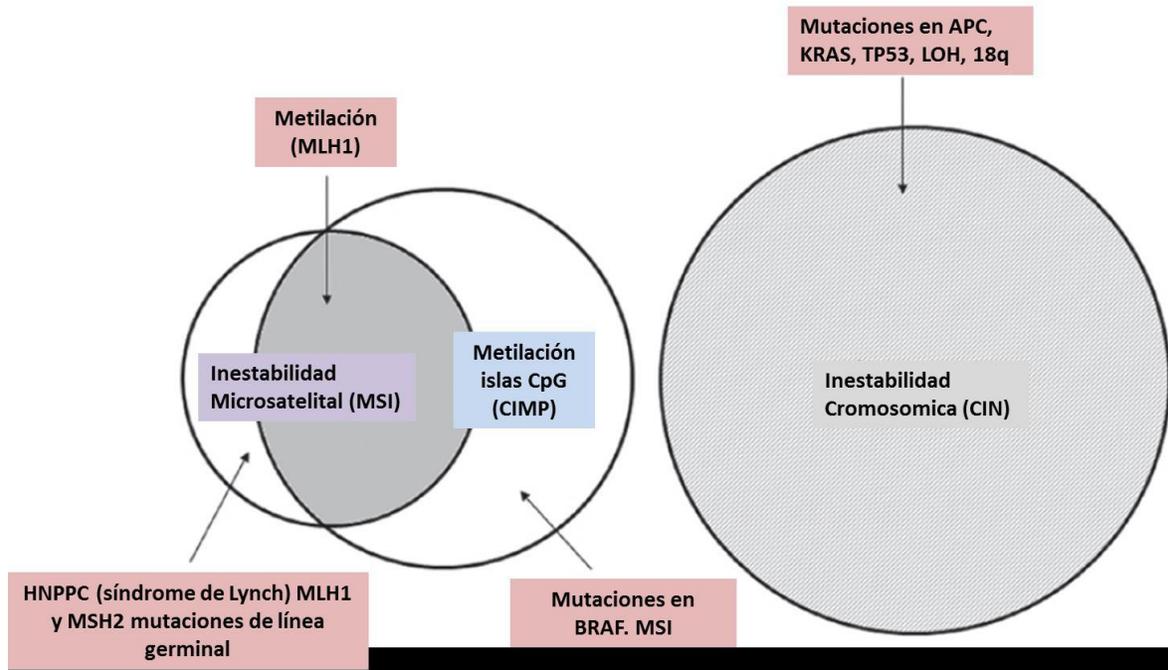


Figura 4. Esquema general de las vías de inestabilidad genética y epigenética que impulsan la aparición y el desarrollo del cáncer colorrectal. CIN, inestabilidad cromosómica; MSI, inestabilidad de microsatélites; CIMP, fenotipo metilador de isla CpG; APC, poliposis adenomatosa; KRAS, protooncogén KRAS GTPasa; BRAF, protooncogén B-Raf serina/treonina quinasa; TP53, proteína tumoral 53; LOH, pérdida de heterocigosidad; HNPPC, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis; MLH1, homólogo 1 de mutL; MSH2, homólogo mutS 2 (Traducido y adaptado de Nguyen et al., 2018).

Se sabe que estas mutaciones están asociadas en la deficiencia de la vía MMR después de la replicación del ADN proceso en el que interviene la proteína MLH1 y el homólogo de mutS MSH2 y si estas proteínas están mutadas ya sea por inactivación mutacional o epigenética su tasa de actividad disminuirá o será eliminada teniendo como resultado el incremento de errores de la replicación y alta tasa mutacional con un alto poder de malignidad (Hudler, 2012; Nguyen et al., 2018) (Figuras 4 y 5).

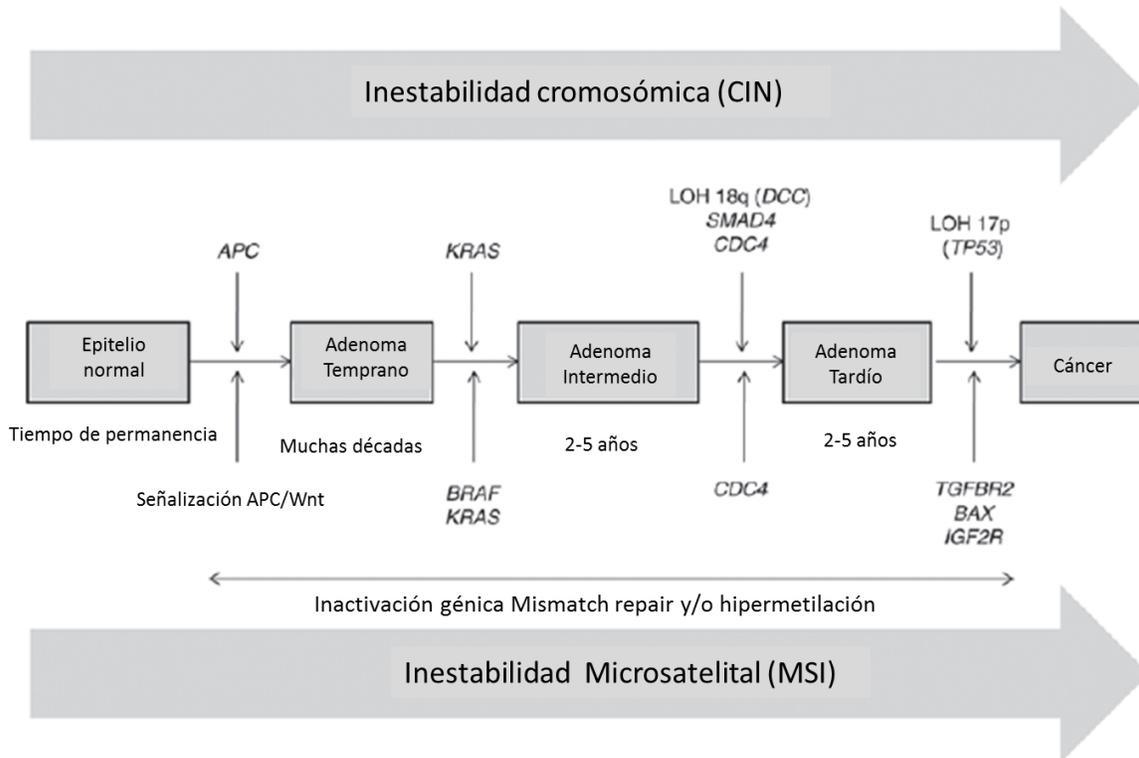


Figura 5. Vía supresora CIN, mutadora MSI y secuencia adenoma-carcinoma. Fearon y Vogelstein propusieron este modelo clásico para la progresión multietapa del cáncer colorrectal. Una mutación en el gen supresor de tumores APC es generalmente considerado como el evento de iniciación. Esto es seguido por la acumulación secuencial de otros cambios epigenéticos y genéticos que eventualmente resultan en la progresión de una célula normal a un tumor metastásico (Adaptado de Rúa & Peña, 2012).

Por último se encuentra la metilación aberrante del ADN o CIMP, se basa en la inactivación de la transcripción debido a una hipermetilación del ADN en las islas CpG en la región promotora de genes supresores tumorales reprimiendo la expresión génica, impidiendo que estos hagan su trabajo permitiendo así la activación de mecanismos oncogénicos (Jass, 2007; Vacas, 2023), se ha identificado en un 30-35% de los casos de CCR en la fase de adenoma y hace parte de la vía de señalización "serrada", termino que se acuñó recientemente y se caracteriza por generación de pólipos aserrados denominados adenomas serrados sésiles (SSA), o pólipos serrados sésiles (SSPs) localizándose en el tejido colónico proximal y se ven al endoscopio como pólipos aplanados que se ubican en la base y ramificaciones de las criptas, o criptas inmaduras, molecularmente presentan mutaciones en BRAF y fenotipo metilador (Figuras 3 – 5) (Nguyen et al., 2018)

En pacientes con cáncer de colon la mayoría de las mutaciones en *APC* producen una proteína truncada, con pérdida del extremo carboxi-terminal (Hanahan & Weinberg, 2011; Smit et al., 2020). Sin embargo, algunas líneas celulares humanas de cáncer de colon bien caracterizadas con mutaciones en *APC* no presentan CIN después de miles de divisiones celulares in vitro (Cabrera & López-Nevot, 2005; Smit et al., 2020). Por lo tanto, es poco probable que únicamente la inactivación de *APC* conduzca por sí misma a un fenotipo CIN en el CCR humano y los del sistema MMR como *MLH1*, *MSH2* y *MSH6*.

El 75 a 80% de los casos que se presentan de CCR son de origen esporádico y del 20 al 25% restantes son de origen familiar o heredado, las mutaciones en el gen *APC* son la causa de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), en tanto las mutaciones en los genes del sistema reparador de bases MMR, *MLH1* y *MSH2* originan el síndrome de Lynch (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer o HNPCC). Ambos síndromes corresponden al CCR hereditario y presentan un patrón de herencia autosómico dominante (Afanador et al., 2022; Lynch et al., 2015).

En este modelo se observa la acumulación progresiva de aberraciones genéticas y epigenéticas de las células que se transforman. Dentro de esta evolución que se da de adenoma a carcinoma se encuentran principalmente: i) MSI, ocurriendo en el 15% de los casos de CRC esporádico, y ii) la CIN, que ocurre en aproximadamente el 85% de los casos con ganancias o pérdidas de cromosomas, regiones o brazos completos, y arreglos cromosomales, lo que genera la pérdida de heterocigidad (LOH,) y resulta además en variaciones de números de copias (CNV, del inglés copy number variations) (Asante et al., 2019; Goel & Boland, 2012) y el fenotipo metilador de islas CpG. (Fearon & Vogelstein, 1990; Nguyen et al., 2018).

Todas estas alteraciones afectan de manera negativa los genes que están asociados al control y correcta progresión del ciclo celular, activando vías de señalización celular a favor de la tumorigenesis que se evidencia cuando hay una progresión de adenoma benigno hasta el carcinoma, un evento que se caracteriza por su dinámica invasiva y metastásica; esta evolución puede tardar años o décadas pasando desapercibido y por ende, escapando del control de la regulación celular (Figura 3) (Migliore et al., 2011; Pavicic et al., 2014; Seguí et al., 2014).

Con relación a las bases moleculares que origina el CRC se encuentra en primer lugar la vía celular CIN, siendo la alteración genética más característica en CCR. Se observa en el 85% de los casos de las transiciones que van de adenoma a carcinoma siguiendo el modelo clásico de carcinogénesis (Migliore et al., 2011). La CIN permite que existan ganancias o pérdidas de altas cantidades de material genético conduciendo a la producción de errores que se evidencian en citogenética como aneuploidías, Re arreglos cromosómicos, deleciones y amplificaciones sub-cariotípicas; también se presenta la alta tasa de LOH en los loci de los genes supresores tumorales (Figura 4) (Burt, 2007; Goel & Boland, 2012).

Entre los ejemplos de genes mutados en el CCR están: i) el gen *KRAS*, un proto-oncogen con actividad GTP-asa que pertenece a la familia de oncogenes *RAS* (*KRAS*); ii) el gen *B-RAF*, un proto-oncogen con actividad serin/treonin kinasa; y iii) el gen *APC* que es un gen supresor tumoral y el gen *TP53* que es un tipo de gen supresor de tumores. También se llama gen de la proteína tumoral p53 y gen *p53* Todos estos genes participan en el desarrollo clásico del CCR donde se sigue los pasos propuestos por Fearon y Vogelstein (1990). Según el modelo, el proceso del cáncer se inicia con una inactivación de *APC* que produce la generación de adenomas; es en esta fase que se presenta las mutaciones oncogénicas en *KRAS* y eventualmente la deleción de la región *q* del cromosoma 18, considerado esto como un marcador de mal pronóstico debido a que hay pérdida de secuencias que genera a *SMAD* y *DCC* supresores tumorales importantes en el modelo de CCR y que están ubicados en la región 18q21.2. Seguido a esto se promueve la inactivación del gen supresor tumoral *TP53* en el cromosoma 17p que ocurre para dar paso a la malignidad del adenoma tardío a carcinoma (figura 3) (Fearon & Vogelstein, 1990a; Migliore et al., 2011).

La segunda vía se relaciona con mutaciones en los genes asociados con MMR, principalmente *MLH1* y *MSH2*, que inducen MSI en las células tumorales (Fearon & Vogelstein, 1990a). Las alteraciones moleculares que se incluyen en el espectro de la carcinogénesis ocurren del 15 al 20% de los tumores generados por cáncer de tipo esporádico y en un 95% de los HNPCC. Los microsatélites son repeticiones en tándem de dímeros CG enlazados por grupos fosfatos (P), ubicados a lo largo del genoma, en la regiones promotoras de los genes entre ellos los de supresión tumoral, dada a inestabilidad no se permiten la activación de estas regiones por lo tanto no hay promoción de estos

genes aumentando la posibilidad de que no hay regulación de proliferación celular. Se conoce que existen alrededor de medio millón de microsatélites que están distribuidos por el genoma y que pueden estar localizados con mayor concentración en regiones promotoras de genes, como también se pueden encontrar entre exones e intrones y dentro de los mismos (Figuras 3-5) (Hendon & DiPalma, 2005; D. Li, 2018).

1.4 La epigenética en el CCR

El término epigenética fue acuñado por Conrad Waddington y se define como los cambios heredados en la expresión de genes que son independientes del cambio en la secuencia del ADN. Dichas modificaciones pueden presentarse por factores externos e internos y presentar efectos similares a los de una mutación patogénica lo que, podría generar un tipo de inactivación de la expresión de genes en tejidos y órganos y consolidar así la iniciación de procesos cancerosos o tumorales, todos estos cambios podrían modificar la expresión de genes supresores tumorales, oncogenes, proto-oncogenes y genes del sistema de reparación del ADN (Afanador Ayala & Muñetón Peña, 2018; Migliore et al., 2011).

Los eventos epigenéticos en el CCR incluyen varios tipos de modificaciones como son metilación, acetilación y silenciamiento de genes gracias a la intervención de ARN no codificantes (ncARN) (Tabla 1), así como también la modificación de histonas y factores medio ambientales que inducen metilación (Migliore et al., 2011). Dentro de estas alteraciones se destaca la metilación del ADN dado por una adición de un grupo metilo (CH_3) en una unión covalente a un nucleósido de citosina, en sitios denominados islas CpG. Los mamíferos tienen aproximadamente del 90% al 98% de estructuras en su genoma bajo condiciones de metilación (Afanador Ayala & Muñetón Peña, 2018; Migliore et al., 2011), lo que resulta en alteraciones del desarrollo de procesos como la duplicación y la transcripción; sin embargo, existen regiones del genoma como las regiones promotoras en donde hay una alta acumulación de islas CpG que no están metiladas marcando una región estable de replicación y muy importante en procesos como la división celular, pero que se pueden reversar, silenciar o hipometilar, asociándose con el incremento en la tasa transcripcional (Migliore et al., 2011) (Tabla 1).

En el desarrollo del CCR es posible que se encuentre la metilación aberrante del ADN o CIMP; esta mutación se basa en la inactivación de la transcripción debido a una hipermetilación del ADN en las islas CpG en la región promotora de genes supresores tumorales reprimiendo la expresión génica, impidiendo que estos hagan su trabajo permitiendo así la activación de mecanismos oncogénicos (Jass, 2007; Vacas.2023). Esta modificación se ha identificado en el 30-35% de los casos de CCR en la fase de adenoma y hace parte de la vía de señalización “serrada”, término que se acuñó recientemente y se caracteriza por generación de pólipos aserrados denominados adenomas serrados sésiles (SSA), o pólipos serrados sésiles (SSPs) que se localizan en el tejido colónico proximal y se ven al endoscopio como pólipos aplanados; se ubican en la base y ramificaciones de las criptas (criptas inmaduras) y molecularmente presentan mutaciones en el gen *BRAF* y un fenotipo metilador (Figuras 3 - 5) (Nguyen et al., 2018)

Tabla. 1. Alteraciones genéticas y epigenéticas en CCR. Adaptado de (Migliore et al., 2011)

| Principales Genes involucrados en CCR | Función génica y cambio epigenético |
|---|--|
| APC Adenomatosis polyposis coli | Supresión de tumores; antagonista de la vía de señalización Wnt |
| MGMT O-6-metilguanina-ADN metiltransferasa. | Reparación del daño del ADN silenciado por la hipermetilación que se correlaciona con mutaciones de G por A en el oncogén K-RAS. |
| CDKN2A/P14 Inhibidor de kinasa 2A dependiente de ciclina alternando el marco de lectura | Supresión de tumores; regulación del ciclo celular; su silenciamiento por hipermetilación está asociado con incremento en el riesgo de padecer CCR. |
| HTF Factor transcriptor tipo helicasa | Re-modelamiento de la cromatina. Miembros de esta familia tienen actividad helicasa y ATPasa y se piensa que regulan la transcripción de ciertos genes por la alteración de la estructura de la cromatina alrededor de ellos. Este silenciamiento podría incrementar el riesgo de CCR. |
| hMLH1, hMLH2 Homólogo de MutL 1, 2 | Reparador del ADN; su silenciamiento, por hipermetilación es asociado con MSI en CCR. |
| UNC5C Unc-5 homólogo C | Receptor de Netrin-1 con actividad supresora de tumores la pérdida de este es particularmente prominente en CCR. |
| DCC Deleted in colorectal carcinoma | Codifica para una proteína de unión a membrana de la familia Cam de inmunoglobulinas y puede funcionar como gen supresor tumoral el cual controla muerte celular. Ha sido identificado en la región q del |

| | |
|---|--|
| | cromosoma 18 el cual presenta delección en el 70% de los casos de CCR. |
| P15 Inhibidor de kinasa 2B dependiente de ciclina | Supresor tumoral, codifica al inhibidor de quinasa dependiente de ciclina y es regulado positivamente por TGF (transforming growth factor). La hipermetilación del promotor de P15 podría provocar el silenciamiento de la expresión génica que se asocia con CCR. |
| P73 Tumor protein 73 | Mapeado en la región 1p36.3. Participa en la respuesta apoptótica frente al daño en el ADN puede ser una proteína supresora tumoral, su silenciamiento por una hipermetilación aberrante se asocia con riesgo de CCR. |

Otro tipo de modificación epigenética es la modificación de histonas en donde se permite el remodelamiento de la cromatina pasando de un estado relajado a uno rígido debido a la metilación de histonas, que consiste en la formación de enlaces covalentes de los grupos metilo con los extremos amino terminales de las histonas. Estas estructuras de ADN empaquetadas no permiten la transcripción o duplicación de las cadenas de ADN, esto podría suceder en regiones del genoma donde se ubican genes supresores tumorales y la cromatina se encuentra hipermetilada y por lo tanto transcripcionalmente inactiva. Sin embargo existe otra modificación en la que la cromatina se relaja transformándose en una cromatina transcripcionalmente activa, permitiendo eventos de duplicación o transcripción y se denomina acetilación, lo que podría suceder en regiones del genoma que codifiquen para proteínas oncogénicas.

1.5 Estadios del CCR

La estadificación del CCR se basa en la clasificación TNM (desarrollado por la Unión Internacional contra el cáncer UICC) que proporciona información sobre la extensión y propagación del carcinoma, permitiendo a los expertos tomar decisiones sobre el tratamiento y a los pacientes entender mejor su situación, con el fin de dar un manejo clínico adecuado (Benson et al., 2023; Amin, et al., 2017; Labianca et al., 2013)

Este sistema tiene en cuenta tres factores principales:

T: Hace referencia al tamaño y la invasión del tumor primario. Se designan valores numéricos crecientes indicando el crecimiento local del tumor desde T1, tumores más pequeños, superficiales, hasta T4, tumores grandes que invaden estructuras adyacentes.

N: Indica la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales o nódulos linfáticos. La clasificación N indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos regionales. Se designan valores numéricos crecientes para indicar la cantidad y ubicación de los ganglios afectados, desde N0, sin metástasis linfática, hasta N3, metástasis en cuatro o más ganglios.

M: Se refiere a la presencia o ausencia de metástasis a distancia en otros órganos. M0 indica la ausencia de esta y M1 indica presencia de metástasis en otros órganos distantes.

Estadios según el sistema TNM:

La combinación de las clasificaciones T, N, M permite determinar el estadio del CCR en los pacientes, y se designan como se muestra a continuación.

Estadio 0: Carcinoma *in situ* (Tis)

Estadio I: T1 – T2, N0, M0

Estadio II: T3 – T4, N0, M0

Estadio III: Cualquier T, N1 – N2, M0

Estadio IV: Cualquier T, cualquier N, M1.

1.6 Sales cuaternarias de amonio y el CCR

Las SCA son una extensa y variada familia que se caracterizan por tener cationes y aniones orgánicos e inorgánicos, Su estructura contiene un átomo de nitrógeno cargado positivamente unido a al menos una cadena hidrocarbonada hidrofóbica, es decir, grupos alquilo, que suelen ser sustituyentes de cadena corta como los grupos metilo o bencilo (Mohapatra et al., 2023), son sales que se caracterizan por tener al menos un catión cuaternario; esto es, un átomo de nitrógeno totalmente sustituido por

grupos carbonados. (Egorova et al., 2017), el anión que acompaña estos cationes puede ser cualquiera de los iones cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, tetrafluoroboratos, sulfatos, entre otros.

La estructura molecular central de los QAC puede tener uno (mono-QAC), dos (bis-QAC) o más (multi-QAC, poli-QAC) átomos de nitrógeno cargados, incluidos muchos compuestos heterocíclicos como piperidina, piridina e imidazol (Mohapatra et al., 2023)

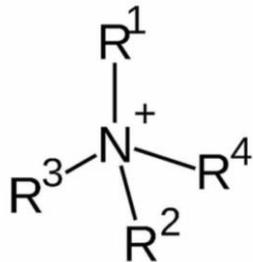


Figura 6. Estructura del catión de Nitrógeno cuaternario (amonio cuaternario), sustituido por cuatro grupos alquilo.

Un ejemplo destacado es el catión (2-hidroxietil) trimetilamonio (más conocida como la colina), es una sal cuaternaria de amonio pequeña y se incorpora a los fosfolípidos generando fosfatidilcolina, la cual hace parte de los fosfolípidos estructurales y funcionales de las membranas biológicas (Boumann et al., 2003; Li & Vance, 2008).

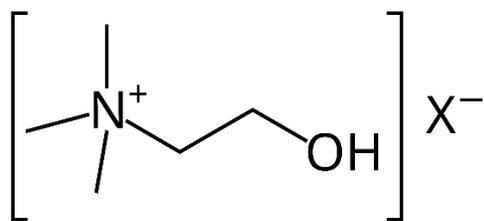


Figura 7. Estructura de la molécula de colina, se observa el cation de amonio cuaternario y una cadena alifática que termina en un grupo alcohol (OH).

En relación al mecanismo de reacción que estos compuestos tienen en células eucariotas es en gran parte desconocido, sin embargo se conoce que en modelos bacterianos la acción tóxica de los SCA contra la pared celular y la membrana de las bacterias se debe a la interacción entre el nitrógeno cuaternario catiónico con los grupos de cabeza de los fosfolípidos ácidos de la membrana y las proteínas bacterianas estructurales cargadas negativamente (Mohapatra et al., 2023, Maillard, 2002,

Gilbert y Moore, 2005). La interacción iónica entre los SCA y la membrana celular de las bacterias desestabiliza la membrana celular, provocando la fuga de material intracelular de bajo peso molecular, proteínas y ácidos nucleicos, lo que da lugar a una rápida lisis celular (Mohapatra et al., 2023, Chapman, 2003).

Además de la alteración de las membranas celulares, las SCA pueden provocar un desequilibrio en la osmorregulación de la membrana, la inhibición de las enzimas respiratorias, la disipación de la fuerza motriz de protones y el estrés oxidativo, que inducen una replicación de ADN propensa a errores y, finalmente, conducen a mutaciones y transferencias genéticas de bacterias (Mohapatra et al., 2023, Blázquez et al., 2012, Ceragioli et al., 2010).

Conocer el modo de acción de estos compuestos y comprender el evento iniciador molecular (MIE) es clave para explicar la eficacia de las SCA. La acción tóxica de estas sales contra la pared celular y la membrana de las bacterias se debe a la interacción entre el nitrógeno cuaternario catiónico con los grupos de cabeza de los fosfolípidos ácidos de la membrana y las proteínas bacterianas estructurales cargadas negativamente (Mohapatra et al., 2023, Maillard, 2002, Gilbert y Moore, 2005).

La toxicidad real, en particular la toxicidad crónica para los seres humanos, sigue siendo desconocida debido a las lagunas de conocimiento en los estudios clínicos y de exposición, incluida la relación dosis-respuesta para múltiples tipos de SCAs; sin embargo se han observado asociaciones entre la concentración de SCA en sangre y las citocinas inflamatorias, la función mitocondrial y los intermediarios de la síntesis de colesterol o la alteración de la homeostasis del colesterol (Hrubec et al., 2021). Entre los hallazgos obetnidos, el estudio informó que el cloruro de benzalconio podría inhibir la expresión del gen DHCR7, que es responsable de proporcionar instrucciones a la 7-deshidrocolesterol reductasa, responsable de la producción de colesterol. Por lo tanto, existe la necesidad de una evaluación adecuada del uso seguro de las SCAs, incluido el estudio epidemiológico y la evaluación de riesgos, así como alternativas de las SCA en variados tipos de aplicaciones así como desinfectantes y biofarmacéuticas (Mohapatra et al., 2023).

En Colombia, el grupo de investigación "Química Teórica y Bioinformática" (QTB) de la Universidad de Caldas ha sintetizado, explorado y estudiado una serie de SCA portadoras o no de átomos de

halógeno enlazados covalentemente a la cabeza catiónica del amonio. Una característica especial de las sales que se han venido estudiando es la presencia de un grupo difenilvinilo en la cola de la estructura en una de las cadenas alifáticas de la molécula; muchas de estas sales hasta ahora exploradas son portadoras o no de átomos de flúor y grupos trifluorometilo en los anillos terminales de la cola de la estructura.

Los atributos biológicos de estas sales son muy variables, así que algunas han demostrado tener una toxicidad aguda mientras otras tienen toxicidad moderada o baja (Gastaud et al., 1998). Los antecedentes del interés farmacológico de estas sales han demostrado en investigaciones anteriores que ejercen un potencial citotóxico, que, sumado al amplio panorama que representan los compuestos fluorados en química medicinal hace de estas moléculas unas prominentes candidatas para su promoción como potenciales agentes terapéuticos para tratamientos anti-neoplásicos (Gastaud et al., 1998; López-Muñoz et al., 2019).

1.6.1 Actividad biológica de algunas SCA

Las SCA han sido estudiadas aproximadamente desde la década de los noventa con fines farmacéuticos diversos. Entre estos, se ha verificado su potencial en el tratamiento de diferentes patologías, tienen efectos antibacteriales (Calvani et al., 1998), antimicóticos (Ng et al., 2006; Oblak et al., 2016), anti-VIH (Shiraishi et al., 2000), antimaláricos (Calas et al., 1997), antileishmaniasis (Duque-Benítez et al., 2016; Mavromoustakos et al., 2001) y anticancerígenos (Shao et al., 2012; Yang et al., 2011, 2013; Yip et al., 2006). Sin embargo, se debe tener en cuenta que las SCA constituyen una extensa familia en la cual la cantidad de modificaciones que se pueden hacer a nivel estructural entre otras como modificar las longitudes de las cadenas alifáticas sustituyentes, adicionando átomos de la familia de halógenos (F, Cl, I o Br), o, agregar anillos alquil bencílicos a esas cadenas de manera terminal (Egorova 2017), son totalmente válidas y no es de esperar que tengan acción biológica por el solo hecho de ser una SCA ya que también pueden tener acción desinfectante.

Sin embargo, todavía no está completamente claro la acción biológica de las SCA; algunas de estas sales se han asociado en parte al parecido estructural del catión cuaternario de amonio, el catión (2 hidroxietil) trimetilamonio, más conocida como la colina, (Figura 6) es una SCA pequeña y se incorpora

a los fosfolípidos generando fosfatidilcolina, la cual hace parte estructural y funcionalmente de las membranas biológicas (Fernandez et al., 2018; López-Muñoz et al., 2019). Por otro lado existen algunas SCA como el cloruro de benzetonio que se utiliza tanto en la industria de medicamentos y farmacéutica, como en protocolos de desinfección (Egorova et al., 2017). Cabe resaltar que los cationes amonio cuaternarios no son por sí solos un farmacóforo, ya que las moléculas requieren de una multitud de rasgos estructurales que, en su conjunto y de manera coordinada, aseguren las interacciones con los complejos sistemas enzimáticos o receptores biológicos para que se evidencie una acción farmacéutica.

1.6.2 Estructura química de las SCA fluoradas y no fluoradas

Las sales que corresponden a este grupo tienen las siguientes características estructurales:

- (a) Son portadoras de dos o tres grupos metilo enlazados a la cabeza catiónica de amonio.
- (b) Algunas de ellas tienen un grupo clorometil o yodometil enlazado al nitrógeno cuaternario.
- (c) En su estructura, la cola carbonada de estas sales es un grupo difenilvinilo terminal.
- (d) Algunas de las sales que contienen átomos de flúor o grupos CF_3 como sustituyentes en los anillos aromáticos del grupo difenilvinilo terminal.

Las SCA con átomos de F o grupos CF_3 han mostrado alta citotoxicidad en células humanas de linaje monocítico U937 y actividad leishmanicida (Figura 6) (Duque-Benítez et al., 2016).

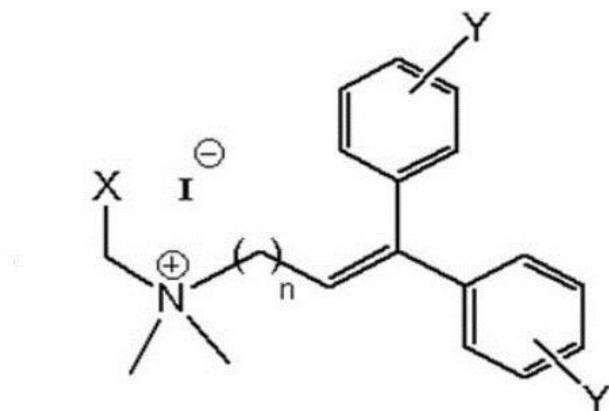


Figura 8. Estructura general de las sales cuaternarias de amonio no fluoradas y fluoradas. La figura muestra las estructuras químicas generales de las sales cuaternarias de amonio no fluoradas

en las cuales “Y” puede ser un átomo de hidrógeno, mientras que en las estructuras “Y” sugiere grupos trifluoro metilo (CF₃) o (F) en posiciones meta o para del anillo difenilvinilo. Adicionalmente, *n* puede ser 3 o 4 átomos de carbono que delimitan la longitud de la cadena alifática.

Se demostró además que la presencia de un grupo N-yodometil o N-clorometil (en lugar de un grupo N-metil) aumenta de manera significativa su bioactividad, asociada además a la presencia del grupo difenilvinilo terminal. En este mismo estudio se detectó que al cambiar la longitud de la cadena carbonada, la bioactividad de estas sales se modificaba de manera sustancial. Al parecer este grupo facilita las interacciones lipofílicas tal vez con las estructuras membranales de organelos o membrana plásmica como tal y permite la absorción intestinal, según los estudios realizados a nuestras moléculas objetivo (Duque-Benítez et al., 2016).

1.6.3 Influencia biológica del grupo difenil-vinilo en la estructura de variadas moléculas farmacéuticas

El grupo difenil vinilo es una entidad química que ha demostrado tener una importancia en química farmacéutica, su estructura se basa en dos anillos fenilo, lo que le confiere una serie de propiedades y aplicaciones en la síntesis y diseño de fármacos (Figura 7) (Anighoro et al., 2014; Leong et al., 2015; L. Li et al., 2007).

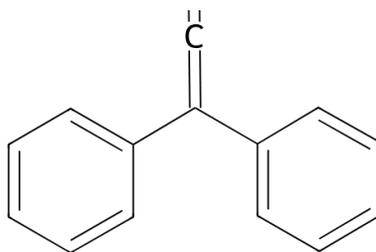


Figura 9. Estructura química del grupo difenil vinilo terminal. Estructura tomada de: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/588544#sid=26753117§ion=2D-Structure>

Este grupo funcional se ha utilizado en la síntesis de medicamentos en variadas actividades farmacológicas, debido a su capacidad para trabajar con diferentes sustratos como receptores y enzimas presentes en los organismos, entre las características que se destacan se encuentra la capacidad para atravesar membranas biológicas y su versatilidad en la modulación de la actividad biológica (Anighoro et al., 2014; Leong et al., 2015; Li et al., 2007).

Los grupos difenilvinilos o bifenilos son un intermediario importante en la química orgánica que constituye el residuo estructural de una amplia gama de compuestos con una profunda actividad farmacológica. Al ser una molécula neutra (debido a la ausencia del residuo funcional activo en ella), se requiere que los bifenilos sean funcionalizados, es decir, se dé la introducción de un grupo activo en ella. Por lo tanto, los bifenilos sustituidos se pueden usar para la síntesis o condensación de otro grupo activo consigo mismo que sea farmacológicamente significativo formando así los compuestos con una actividad completamente nueva (Jain et al., 2017).

Una de las aplicaciones más notables del grupo difenilvinilo es su uso como ligando en la síntesis de inhibidores de proteasas, enzimas cruciales para el correcto desempeño del sistema proteolítico y cuyo mal funcionamiento puede estar asociado a enfermedades como el cáncer, el SIDA o enfermedades neurodegenerativas. Algunos estudios han demostrado que compuestos que contienen el grupo difenil vinilo como parte de su estructura pueden interactuar con sitios activos de estos inhibidores de proteasas, bloqueando su actividad y ejerciendo un efecto terapéutico (Anighoro et al., 2014; Leong et al., 2015; L. Li et al., 2007).

Además de su papel en la inhibición de la síntesis de proteasas, el grupo difenil vinilo ha sido empleado como parte de la estructura de agentes antitumorales. Se ha observado que ciertos derivados de difenil vinilo pueden interactuar con receptores específicos presentes en células cancerosas, induciendo la muerte celular programada. Esta capacidad de inducir la muerte selectiva de células cancerosas ha despertado un gran interés en la comunidad científica y se ha convertido en un área de investigación activa en la química farmacéutica (Anighoro et al., 2014; Leong et al., 2015; L. Li et al., 2007).

Se ha encontrado que los derivados de bifenilo muestran un perfil anticancerígeno por ejemplo, contra el cáncer de mama, Dentro de la literatura hasta el momento, existe una gama de derivados del

eugenol en los que se incluyen grupos tales como nitro, chalcona, bis indolil, triclosán, bifenilos, entre otros y la serie puede explorarse aún más (Jain et al., 2017).

El grupo difenil vinilo también se usa en la síntesis de fármacos con propiedades antioxidantes. Se ha demostrado que compuestos que contienen esta estructura pueden actuar como donantes de electrones, neutralizando especies reactivas de oxígeno y reduciendo el estrés oxidativo en los organismos. El estrés oxidativo está asociado a una serie de enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatorias y cáncer, por lo que el desarrollo de fármacos con propiedades antioxidantes es de gran interés terapéutico (Leong et al., 2015; L. Li et al., 2007)

Por otra parte, el grupo difenil vinilo ha sido utilizado en la síntesis de fármacos con actividad antiinflamatoria, analgésica y antiviral. Su estructura rígida y planar permite una interacción óptima con los sitios activos de las enzimas o receptores diana, lo que contribuye a mejorar su potencia en la selectividad (Anighoro et al., 2014).

Existen diferentes estrategias y métodos disponibles para la síntesis de compuestos que contienen el grupo difenil vinilo. La síntesis clásica de esta entidad química implica reacciones de acoplamiento entre arilos y alquenos, como la reacción de Heck o la reacción de Suzuki-Miyaura. Estas reacciones permiten la formación selectiva del enlace C-C entre los anillos fenilo y el alqueno, generando el grupo difenil vinilo deseado (Anighoro et al., 2014; Leong et al., 2015; L. Li et al., 2007).

Muchos fármacos contienen el grupo difenil vinilo de manera terminal o análogos a este grupo dentro de su estructura tales como la amitriptilina (Figura 10a), que se usa como antidepresivo y para el tratamiento de diversos trastornos mentales (Williams et al., 2013). Es una molécula tricíclica en la cual dos anillos aromáticos (también enlazados entre sí por un lazo de dos grupos metileno) están enlazados a un grupo vinilo.

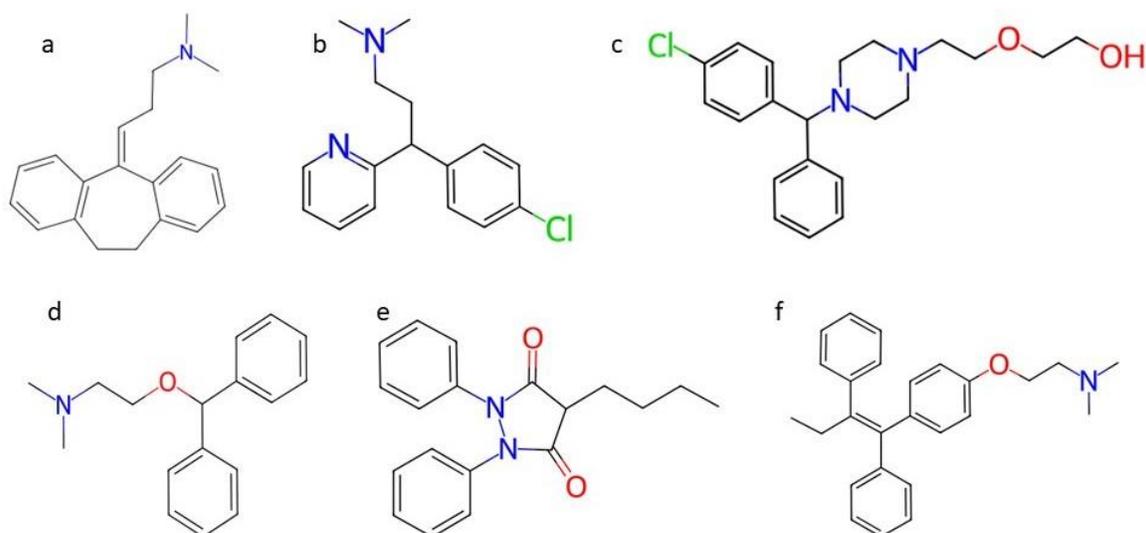


Figura 10. Estructura química de compuestos con grupo difenil vinilo. Amitriptilina (a), clorfeniramina (b), hidroxicina (c), dimenhidrinato (d), fenilbutazona (e) y tamoxifen (f). Estructuras tomadas de la plataforma ChEMBL https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/ChEMBL/

Otras moléculas de interés medicinal, por ejemplo, la clorfeniramina (Figura 10b), la hidroxicina (Figura 10c) y el dimenhidrinato (Figura 10d) que son antihistamínicos de uso comercial (Williams et al., 2013), contienen dos grupos fenilo como sustituyentes en uno de los extremos de la cadena carbonada. Aunque en estos compuestos no hay grupo vinilo en el extremo de la cadena, la estructura guarda un rasgo similar al grupo difenil vinilo terminal o adoptan formas moleculares con algún parecido a este grupo.

Por su parte la fenilbutazona (Figura 10e), un antiinflamatorio no esterooidal y analgésico de uso veterinario (Williams et al., 2013), guarda alguna similitud estructural con el grupo difenil vinilo terminal; en un extremo de la cadena carbonada, la fenilbutazona se bifurca con grupos conjugados a ambos lados que terminan en grupos fenilo. Adicionalmente, el tamoxifen (Figura 10f), medicina complementaria para el tratamiento post-quirúrgico del cáncer de mama (Williams et al., 2013), guarda alguna correlación estructural con el tipo de moléculas mencionadas.

En resumen, el grupo difenilvinilo es un valioso componente en la química farmacéutica, con un amplio rango de aplicaciones terapéuticas. Su estructura rígida y su capacidad para interactuar con diferentes blancos biológicos hacen de este grupo funcional una herramienta versátil en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. La continua investigación en esta área promete revelar nuevas aplicaciones y beneficios terapéuticos asociados al grupo difenilvinilo, generando grandes avances en la ciencia y la medicina.

1.6.4 Flúor y grupo CF₃ interesantes sustituyentes orgánicos en moléculas de interés biológico.

El flúor es un elemento de vital importancia en química medicinal, ya que imparte propiedades únicas a las moléculas orgánicas donde se incorpora, alterando sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Del 20-25% de las moléculas utilizadas como principios activos farmacéuticos alrededor del mundo contienen al menos un átomo de flúor en su estructura.

El CF₃ tiene una demanda estérica escasa esto debido a que su radio de Van der Waals es muy pequeño. El radio de Van der Waals está definido como el radio de una esfera sólida imaginaria empleada para modelizar el átomo el cual representa la mitad de la distancia más cercana posible de aproximación entre dos radios atómicos o moléculas en una interacción no enlazante. El radio del grupo CF₃ es similar al del grupo isopropilo, sugiriendo que estos dos grupos ocupan un volumen bastante similar (Charles et al., 1957; Isanbor & O'Hagan, 2006; Lopez & Romero, 2011; Tomasz & Borek, 1959). Por otra parte, el grupo CF₃ tiene alta electronegatividad, y el enlace C-F es muy estable frente a transformaciones metabólicas, alta lipofilia lo cual contribuye a facilitar la distribución de las moléculas que lo contienen dentro de las membranas biológicas que se encuentran en las células humanas por su carácter anfipático, también tiene participación en los puentes de hidrógeno que se puedan formar a través de sus pares de electrones libres (Isanbor & O'Hagan, 2006).

En particular, el grupo trifluorometilo es uno de los sustituyentes fluorados más comunes en química medicinal, aunque no es el único, también está el grupo pentafluorosulfanilo (-SF₅) o supertrifluorometilo promovido como un nuevo bioisómero del grupo trifluorometilo (-CF₃). Sin

embargo, las cualidades del CF_3 siguen siendo protagonistas ya que ofrece de manera simultánea una alta lipofilia, elevada densidad electrónica y demanda estérica similar a la del grupo isopropilo grupo que también se encuentra en varias moléculas con acción medicinal. (Isanbor & O'Hagan, 2006; Lopez & Romero, 2011)

En química medicinal se suele hacer el cambio isostérico del grupo metilo (CH_3) por trifluorometilo (CF_3). Este suele encontrarse con cierta frecuencia en diversas publicaciones de química medicinal; sin embargo, es importante recordar que el volumen de estos dos grupos no es similar ya que el volumen del grupo CH_3 es menor que CF_3 y que el efecto estérico causado por este último es una variable importante para considerar en las interacciones fármaco-receptor debido a que se ha demostrado mayor efectividad en los tratamientos con el grupo CF_3 que con CH_3 . (Lopez & Romero, 2011; Williams et al., 2013).

El CF_3 está presente en fármacos de uso clínico tales como el Efavirez (anti-HIV) y la 26,26,26-f3-12,13-Desoxiepotilona b que es un anticancerígeno, entre otros, CF_3 se ha hecho hoy en día cada vez más frecuente en moléculas disponibles para el mercado farmacéutico. Hoy en día, muchos de los retos a los que se enfrenta la industria farmacéutica imponen la necesidad de terapias innovadoras y eficaces. La investigación de terapias alternativas y eficientes a nivel del cáncer es un objetivo actual de la industria farmacéutica. (Lopez & Romero, 2011).

1.7 Metabolómica y el estudio de perfiles metabolómicos en CCR

Definida como "el análisis exhaustivo y cuantitativo de todos los metabolitos presentes en una célula, tejido o muestra biológica específica", la metabolómica se enfoca en caracterizar y cuantificar las pequeñas moléculas en respuesta a un estrés, estímulo o manipulación genética. Sus aplicaciones incluyen estudios de toxicidad, desarrollo de medicamentos, monitoreo de cultivos celulares, diagnóstico de enfermedades, nutrición, oncología y trasplante.

La metabolómica es el estudio a gran escala (que se asume total) de los metabolitos, las moléculas químicamente diversas que componen el metabolismo y que se evalúan en condiciones específicas. El conjunto de estos metabolitos se denomina metaboloma, que refleja la fisiología de los sistemas

biológicos a nivel de pequeñas moléculas endógenas de bajo peso molecular (<1500 Da), con funciones bioenergéticas, estructurales y de señalización.

Existen dos enfoques principales en la metabolómica: *targeted* (dirigido), que cuantifica absolutamente los metabolitos específicos usando estándares, útil para entender cambios en rutas metabólicas conocidas, y *untargeted* (no dirigido), que extiende el análisis a todos los metabolitos potencialmente detectables, permitiendo el descubrimiento de nuevos metabolitos y generando hipótesis sobre sus funciones biológicas (Liu & Locasale, 2017). Generalmente, los estudios robustos comienzan con un análisis no dirigido para identificar candidatos a biomarcadores, que luego se validan con un análisis cuantitativo dirigido.

A diferencia de genes, transcritos y proteínas, que son especie-específicos, muchos metabolitos son comunes a todas las especies, con solo una parte del metaboloma siendo específica de una especie determinada.

1.7.1 Herramientas utilizadas para el estudio del metaboloma

Para el estudio del metaboloma, se utilizan herramientas que detecten una gran cantidad de metabolitos al mismo tiempo. Las principales herramientas consisten en la resonancia magnética nuclear (RMN) que es una técnica espectroscópica poderosa que permite estudiar a nivel atómico y estructural moléculas de interés biológico. Complementaria a la técnica de rayos X, constituye una herramienta fundamental para la determinación de estructuras de proteínas, aminoácidos y otras biomoléculas en solución. Sin embargo, a diferencia de otras técnicas del campo de la biología estructural, brinda información sobre procesos dinámicos, lo cual representa una de sus características más sobresalientes y en consecuencia, su versatilidad determina que sea ampliamente utilizada. Respecto a los alcances y aplicaciones, se puede mencionar desde la elucidación de compuestos pequeños en la química orgánica, la determinación de estructuras de moléculas biológicas y sus interacciones, y el estudio cinético de reacciones; hasta el diseño racional de drogas y el diagnóstico por imágenes en medicina. Keeler J. *Understanding NMR Spectroscopy*, Department of Chemistry, University of Cambridge, UK, 2005.

Por su parte la espectrometría de masas (MS) detecta moléculas induciendo carga, separándolas y detectándolas por su relación masa/carga (m/z). El espectrómetro de masas consta de tres partes principales: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector, que envía las señales a la computadora para su interpretación. Para mejorar la resolución, se utiliza un sistema de separación cromatográfica que proporciona una dimensión adicional de tiempo de retención (RT). La MS en tándem (MS/MS) incluye una celda de colisión que fragmenta los iones. Los iones íntegros se denominan iones precursores, y los fragmentos, iones producto. El patrón de fragmentación, reproducible bajo condiciones similares, permite identificar moléculas mediante su estructura y composición elemental (Gross, 2017).

Estas técnicas pueden utilizarse de manera complementaria para responder distintas preguntas. La MS tiene algunas ventajas sobre la NMR, como su mayor sensibilidad, menor volumen de muestra necesario para un análisis y una mayor cantidad de bases de datos para la identificación de metabolitos, entre otros (Marshall y Powers, 2017; Bujak et al., 2015; Lindon & Nicholson, 2008).

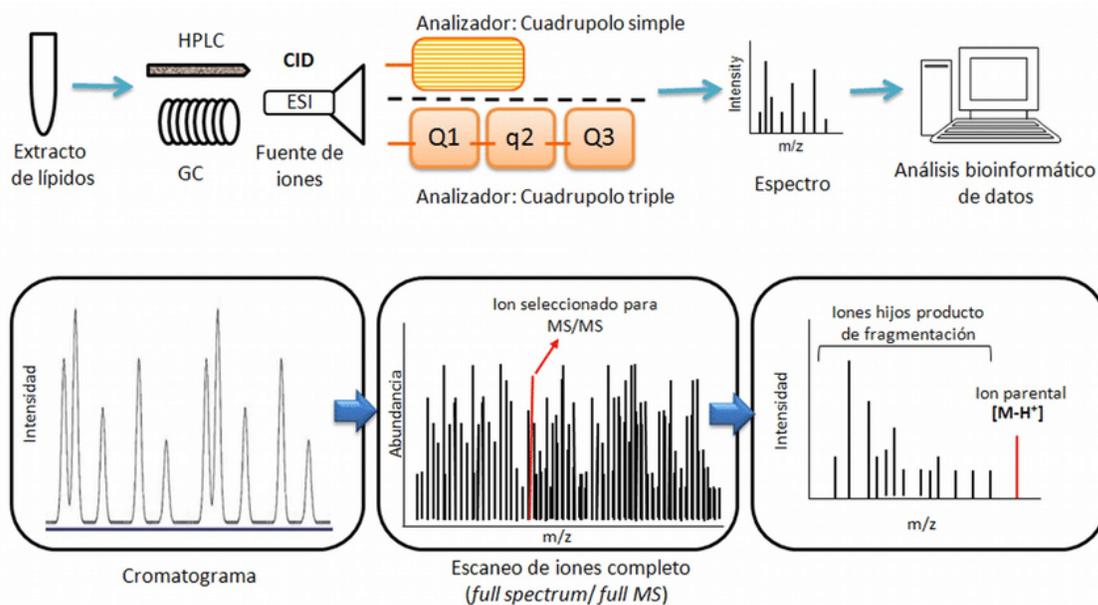


Figura 11. Esquema general de un análisis de espectrometría de masas acoplado a un equipo de UHPLC. Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia. Tomado de Lockhart *et al.*, 2017.

2. Antecedentes

Las SCA han demostrado propiedades antitumorales en varios tipos de cánceres entre las que se incluye la capacidad de inducir estrés oxidativo, daño en el ADN y apoptosis celular (Egorova et al., 2017).

Las SCA más parecidas estructuralmente a las sales de esta investigación, estudiadas contra células de cáncer de cuello y cabeza, son el bromuro de cetrimonio (Ito et al., 2009) y el cloruro de benzetonio (Yip et al., 2006) que son sales cuaternarias de N-alkil-N,N,N-trimetil amonio sin presencia de grupo difenilvinilo terminal o porciones estructurales relacionadas. Adicionalmente se confirmó que los átomos de halógeno, particularmente yodo y cloro incorporados a uno de los grupos N-metilo de la cabeza catiónica cuaternaria de amonio evidencian interacciones supramoleculares especiales que permiten entender como es que las especies químicas se mantiene unidas mediante una variedad de interacciones no covalentes donde su fuerza va de 2-300 kJmol⁻¹. Las interacciones no covalentes utilizadas para la formación de sistemas supramoleculares son de tipo iónico. (Múnica-Orozco et al., 2015) que deberían valorarse y establecer si tienen alguna significancia biológica en los estudios de variados tipos de cáncer.

La SCA de β -pineno (β -PQA) es un monoterpene aislado del aceite de trementina y otros aceites esenciales de otras plantas, que tiene un amplio espectro de actividades biológicas tales como antifúngica, antibacteriana y antitumoral, exhiben actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer de colon HCT-116 y de cáncer de mama MCF-7, con valores de IC₅₀ que oscilan entre 1,1 y 25,54 μ M, indicando que las SCA son potenciales compuestos antitumorales (Li Zhang et al., 2021). Así mismo, SCA de fenantroindolizidinas han mostrado una citotoxicidad pronunciada contra diferentes líneas celulares cancerosas humanas (Omran et al., 2021). Por último, un estudio realizado con líquidos iónicos (Lis) en líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon Caco-2 y células de carcinoma de hígado HepG2 indicó que las SCA portadoras de átomos de flúor o grupos fluorados en su estructura tienen un potencial citotóxico importante (Pereiro et al., 2013).

En un estudio se sintetizaron 18 tintes de cianina pertenecientes al grupo de SCA y se evaluó la influencia de la naturaleza heterocíclica, el contraión y la longitud de la cadena de metino sobre los

efectos antiproliferativos y las selectividades; se recopiló además los datos relevantes de la relación estructura-actividad. La mayoría de los colorantes de cianina de monometino y trimetino demostraron un alto efecto antiproliferativo en las líneas de células tumorales humanas de cáncer colorrectal (Caco-2), de mama (MCF-7) y de próstata (PC-3) en la selección inicial (10 μM). En especial un colorante el monometino de cianina derivado de benzoxazol fue el compuesto más prometedor con un IC_{50} para Caco-2=0,67 μM y un índice de selectividad de 20,9 para Caco-2 frente a fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) que condujo a la detención del ciclo celular de Caco-2 en la fase G0/G1 (Serrano et al., 2022). Interpretese los IC_{50} como la mitad de la concentración inhibitoria máxima (CI_{50}) o la concentración citotóxica del 50 % (CC_{50}) o la mitad de la concentración efectiva máxima (CE_{50}), o términos relacionados de la muestra. Indicando además que el cálculo de EC_{50} se hace utilizando el modelo logístico de cuatro parámetros (4LP) que se puede aplicar bien si hay al menos dos concentraciones más allá de los puntos de inflexión inferior (mín.) y superior (máx.), es decir, más allá de la parte lineal de la curva. (Indrayanto et al., 2021).

El β -pineno es un monoterpeno aislado del aceite de trementina y de numerosos aceites esenciales de otras plantas, que tiene un amplio espectro de actividades biológicas. En un estudio se sintetizaron y evaluaron *in vitro* seis nuevas sales de amonio cuaternario de β -PQA por sus actividades antifúngicas, antibacterianas y anticancerígenas. Los resultados del ensayo *in vitro* revelaron que los compuestos de la actividad anticancerígena demostraron que 4 de 6 compuestos exhibieron una actividad notable contra las líneas celulares HCT-116 y MCF-7, con valores de IC_{50} que oscilaron entre 1,1 y 25,54 μM . En particular, uno de ellos el compuesto denominado "bis-hydronopyl dimethyl ammonium chloride", mostró la citotoxicidad más alta frente a las líneas celulares HCT-116 y MCF-7, con valores IC_{50} de 1,10 y 2,46 μM , respectivamente (Li Zhang et al., 2021), indicando que estos compuestos de amonio cuaternarios son potentes antictumorales.

En otro estudio, se desarrollaron SCA de fenantroindolizidinas las cuales mostraron una alta estabilidad química y metabólica y se predijo que no penetraron a través de la barrera hematoencefálica. Los profármacos diseñados mostraron una citotoxicidad reducida cuando se probaron en condiciones normóxicas. Sin embargo, su actividad citotóxica aumentó considerablemente cuando se probaron en condiciones hipóxicas. Se caracterizan por actividades

biológicas interesantes, como una citotoxicidad pronunciada contra diferentes líneas celulares cancerosas humanas (Omran et al., 2021).

Por otro lado, se han usado SCA como medio para marcar tejido de manera fluorescente a largo plazo utilizando una porfirina adhesiva de tejido con policationes que consisten en grupos de SCA, lo anterior es un gran avance para identificar y localizar tumores que serán retirados en cirugía laparoscópica esto se hizo con el objetivo de mejorar la marcación ya que técnicas anteriores de marcado no han sido tan eficientes. La fluorescencia roja de la porfirina adhesiva al tejido fue visible incluso después de 7 días debido a las interacciones electrostáticas entre los restos cargados positivamente del polication en la porfirina adhesiva al tejido y las moléculas cargadas negativamente en el mismo (Komatsu et al., 2022).

Por último, merecen mención los antecedentes en la literatura de compuestos correlacionados con la colina, SCA que contiene el catión de N'-N'-N'-trimetil etanolamina, y que tienen efectos anticancerígenos. Por ejemplo la perifosina ($C_{25}H_{52}NO_4P$) está relacionada estructuralmente con la meltifosina ($C_{21}H_{46}NO_4P$) y está siendo investigada contra CCR (Richardson et al., 2012).

3. Planteamiento del problema

Actualmente, la quimioterapia es una estrategia clave para tratar diversas neoplasias, incluyendo el cáncer colorrectal (CCR). Esta terapia se basa en la citotoxicidad de muchos agentes químicos, especialmente aquellos con sustituyentes fluorados, que han demostrado ser más efectivos. Las sales de amonio cuaternario (SCA), pertenecientes a los líquidos iónicos, también muestran potencial anti-tumoral.

En colaboración con los grupos de investigación PECET y QTB, se han desarrollado series de SCA fluoradas y no fluoradas con potencial antiparasitario. Estudios previos indican que las SCA N-halometiladas y no halometiladas, fluoradas y no, presentan una toxicidad considerable en células humanas de linaje monocítico.

La hipótesis de este trabajo es confirmar si la citotoxicidad de estas SCA es reproducible en líneas celulares de CCR, lo que podría convertirlas en alternativas prometedoras como agentes anticancerígenos y verificar su aplicabilidad quimioterapéutica. Este estudio se basa en la literatura científica que respalda el potencial anti-neoplásico de algunas SCA y el efecto potenciador de los grupos fluorados en moléculas bioactivas. La estructura de las sales utilizadas, con grupos difenil vinilo terminales, es considerada valiosa para su significancia biológica, especialmente con anillos aromáticos fluorados.

El trabajo no solo evaluará la citotoxicidad de las SCA fluoradas y no fluoradas en líneas celulares de CCR, sino que también investigará la respuesta bioquímica y fisiológica específica en diferentes contextos genéticos y epigenéticos. El objetivo es identificar correlaciones entre genotipo y fenotipo para apoyar tratamientos en pacientes, dado que las mutaciones que se están en el genotipo afectan de manera tacita el fenotipo de los modelos evaluados y es interesante observar la posibilidad que estos fenotipos perse que poseen los modelos cambien bajo la inducción de las SCAs del estudio y estos resultados sean extrapolables a un contexto *in vivo* permitiendo aportar al conocimiento unas nuevas moléculas con características especiales para el tratamiento de enfermedades ocológicas. Además, se buscará identificar rutas metabólicas específicas mediante análisis metabolómicos, lo que ayudará a comprender el mecanismo de acción de estas SCA y a mejorar su diseño para aumentar su eficacia y selectividad.

4. Justificación

Actualmente, el tratamiento del CCR depende de la naturaleza y el contexto genético del tumor. A pesar de los esfuerzos por personalizar las terapias según el contexto genético de cada paciente, los tratamientos disponibles no han logrado una secuencia adecuada, que aunque han funcionado para muchos pacientes aun hay otros a los cuales todavía no, por lo tanto es importante seguir en la búsqueda de estas alternativas para mejorar especificidad y singularidad en el diagnóstico y el tratamiento a seguir. Por lo anterior, es crucial buscar alternativas terapéuticas que consideren tanto el contexto genético y epigenético como la respuesta fisiológica celular para individualizar y potenciar la efectividad de los tratamientos.

Describir solo los biomarcadores moleculares de un tumor no es suficiente para entender la respuesta celular completa. Es necesario estudiar las condiciones fenotípicas y fisiológicas junto con los biomarcadores moleculares para ampliar la comprensión de la respuesta celular a un agente terapéutico.

Los resultados obtenidos por el PECET y QTB sugieren que las SCA tienen un potencial citotóxico modulable, lo que las convierte en candidatos prometedores para tratamientos antineoplásicos debido a su potencial citotóxico y a la relevancia de los compuestos fluorados en química medicinal.

Es esencial realizar un estudio integral de estas SCA en líneas celulares de CCR, para verificar su impacto metabólico en la bioquímica y fisiología de las células neoplásicas. Esto permitirá comprender las rutas afectadas y los mecanismos de acción de las SCA en CCR.

Identificar las rutas metabólicas y los procesos bioquímicos afectados por las SCA es un reto crucial en el diseño de terapias para el cáncer. La metabolómica ofrece perfiles metabólicos que pueden categorizar la respuesta al tratamiento y determinar biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta terapéutica, fundamentales para el desarrollo racional de medicamentos.

El desarrollo del CCR implica complejas alteraciones moleculares y citogenéticas que determinan el fenotipo canceroso. Los estudios metabolómicos enriquecen la comprensión de estos eventos y de la respuesta a tratamientos, impulsando el descubrimiento de rutas metabólicas y la carga de alteraciones moleculares y genéticas en la fisiología celular. También ayudan a caracterizar el cáncer, sus estadios y diferencias con otros tipos de cáncer, además de proporcionar indicios sobre la acción de terapias antineoplásicas in vitro.

Para Colombia y la región, este estudio representa un avance significativo, ya que no existen antecedentes de estudios metabolómicos en líneas celulares de CCR. Los resultados permitirán descubrir nuevos biomarcadores con potencial diagnóstico, pronóstico o terapéutico y validar una nueva familia de moléculas con potencial antitumoral, marcando un hito tecnológico regional..

5. Preguntas de investigación

- 1) ¿Cuál es el efecto fisiológico y bioquímico de las SCAF en las líneas celulares de CCR con fenotipo pre-metastásico (SW948), metastásico *in situ* (SW48) y metastásico invasivo (SW620)?.
- 2) ¿Cuales son las rutas metabólicas implicadas en la citotoxicidad y muerte celular causada por las SCAFs?

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar los efectos fisiológicos y bioquímicos inducidos por las SCA fluoradas (SCAF) y no fluoradas (SCA no F) en tres líneas celulares de cáncer colorrectal (CCR) con fenotipo pre-metastásico (SW948), metastásico *in situ* (SW48) y metastásico invasivo (SW620).

5.2 Objetivos Específicos

- 5.2.1 Identificar *in silico* las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las SCAF y SCA no F, y las características genéticas y epigenéticas de las líneas celulares de CCR del estudio.
- 5.2.2 Determinar la citotoxicidad de las SCAF y las SCA no F en líneas celulares de CCR del estudio.
- 5.2.3 Determinar el fenotipo de muerte celular inducida por una serie de SCAF en líneas celulares CCR con diferentes background genéticos y epigenéticos.
- 5.2.4 Realizar análisis metabolómicos con el fin de obtener información sobre los metabolitos que estén alterados, afectados, modificados o asociados con la inducción de muerte celular por 2 SCAFs con mayor actividad citotóxica en una línea celular de CCR
- 5.2.5 Identificar las posibles vías metabólicas alteradas, afectadas, modificadas o asociadas con la inducción de muerte celular de las 2 SCAFs con mayor actividad citotóxica en una línea celular de CCR.

6. Materiales y métodos

6.1 Síntesis de SCAF y SCA no F

Se sintetizaron 14 SCAF y 2 SCA no F siguiendo la metodología descrita previamente en la literatura (Duque-Benítez et al., 2016; Fernandez et al., 2018; López-Muñoz et al., 2019; Ríos, L. A.; Ocampo, R.; Duque, S. M.; Robledo, S.M.; Vélez, I. D.; Cedeño, D. L.; Jones, 2015) con modificaciones descritas por (Fernandez et al., 2018). Los compuestos se sintetizaron en los laboratorios del grupo QTB de la Universidad de Caldas y remitidos al PECET para los análisis biológicos y metabolómicos.

Las fórmulas condensadas para estas SCAF sintetizadas fueron: $C_5CH_3mF_2$ a la que se asignó el código (1), C_5lpF_2 (2), C_6ClpF_2 (3), C_6lpF_2 (4), C_5ClmCF_3 (5) C_5lmCF_3 (6), $C_5CH_3mCF_3$ (7), C_5ClpCF_3 (8), C_5lpCF_3 (9), $C_5CH_3pCF_3$ (10), C_6lmCF_3 (11) C_6ClpCF_3 (12), C_6lpCF_3 (13) y $C_6CH_3pCF_3$ (14). Por su parte, las fórmulas condensadas para las SCA no F fueron C_5l (15) y C_6l (16) (Tabla 2).

Las sales se solubilizaron en Dimetil sulfoxido (DMSO Fischer Chemical, NJ. USA) la concentración del stock fue de 50,000 $\mu\text{g/mL}$ y se almacenaron a -20°C hasta su uso. A partir de la solución stock se prepararon 6 diluciones dobles seriadas 1:2 de cada compuesto iniciando con 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ y 6.25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Tabla 2. Códigos, nombres y masa molar de las SCAF y SCA no F sintetizadas en el estudio.

| Código librería | Códigos | Nombre IUPAC | Masa (g/mol) |
|-----------------|---------------|--|--------------|
| 1 | $C_5CH_3mF_2$ | Yoduro de <i>N</i> -[5,5-bis(3-fluorofenil)-pent-4-en-1-il]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio | 443,3 |
| 2 | C_5lpF_2 | Yoduro de <i>N</i> -[5,5-bis(4-fluorofenil)-4-penten-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 569,2 |
| 3 | C_6ClpF_2 | Yoduro de <i>N</i> -clorometil- <i>N</i> -[6,6-bis(4-fluorofenil)-5-hexen-1-il]- <i>N,N</i> -dimetilamonio | 491,8 |

| | | | |
|----|---|---|-------|
| 4 | C ₆ IpF ₂ | Yoduro de <i>N</i> -[6,6- <i>bis</i> (4-fluorofenil)-5-hexen-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 583,2 |
| 5 | C ₅ ClmCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -clorometil- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(3-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]amonio | 577,7 |
| 6 | C ₅ ImCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(3-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 669,2 |
| 7 | C ₅ CH ₃ mCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(3-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio | 543,3 |
| 8 | C ₅ ClpCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -clorometil- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]amonio | 577,8 |
| 9 | C ₅ IpCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 669,2 |
| 10 | C ₅ CH ₃ pCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[5,5- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-4-penten-1-il]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio | 543,3 |
| 11 | C ₆ ImCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[6,6- <i>bis</i> -(3-trifluorometilfenil)-5-hexen-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 683,3 |
| 12 | C ₆ ClpCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -clorometil- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -[6,6- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-5-hexen-1-il]amonio | 591,8 |
| 13 | C ₆ IpCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[6,6- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-5-hexen-1-il]- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 683,2 |
| 14 | C ₆ CH ₃ pCF ₃ | Yoduro de <i>N</i> -[6,6- <i>bis</i> -(4-trifluorometilfenil)-5-hexen-1-il]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio | 557,4 |
| 15 | C5I | Yoduro de <i>N</i> -(5,5-difenil-4-penten-1-il)- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 533,2 |
| 16 | C6I | Yoduro de <i>N</i> -(6,6-difenil-5-hexen-1-il)- <i>N,N</i> -dimetil- <i>N</i> -yodometilamonio | 547,1 |

6.2 Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para este ensayo se usaron las siguientes líneas celulares: SW948 Dukes' type C, grade III, adenocarcinoma colorrectal pre metastásico, obtenido de donante femenina de 81 años (ATCC® CCL237™); SW48 Dukes' type C, grade IV, adenocarcinoma colorrectal *in situ* o no invasivo obtenido de donante femenina de 83 años (ATCC® CCL231™); y SW620 Dukes' type C, grado IV

adenocarcinoma colorrectal invasivo derivado del sitio metastásico: ganglio linfático; obtenido de donante masculino de 51 años (ATCC® CCL227™) todas las líneas celulares fueron adquiridas desde el American Type Culture Collection (Manasas, VA, USA). Las líneas celulares SW fueron cultivados en medio Leibovitz's-15 (L-15) (Caison), suplementado al 10% con SFB (Gibco), L-Glutamina al 1% (Caison) y penicilina/estreptomicina al 1% (Caison), se mantuvieron a 37°C, sin flujo de CO₂

Con el fin de determinar la selectividad de los compuestos SCAF y SCA no F para células tumorales de CCR, se usaron como control de los ensayos células tipo fibroblastos humanos con fenotipo normal Detroit 551 (ATCC® CCL110™), también adquiridas del ATCC (Manasas, VA, USA), así como control de los ensayos de citotoxicidad tejido colorrectal de ratones BALB/c sanos (TCRM) y cultivo primario de ppheriferal blood mononuclear cells (células mononucleares derivada de sangre periférica) (CMSP) de donantes sanos.

Por su parte, las células Detroit 551 se cultivaron en medio DMEM también suplementadas al 10% con SFB (Gibco) y penicilina/estreptomicina al 1% (Caison), mientras que los CMSP se cultivaron en medio RPMI 1640. Manteniéndose con flujo de 5% de CO₂. Cada 72 h se cambió el medio de cultivo. El TCRM se usó inmediatamente después de su obtención, mantenido en medio RPMI 1640.

6.3 Consulta bibliografía en relación a las líneas celulares de CCR

Con el objetivo de conocer el background genético en relación con las alteraciones o mutaciones de cualquier tipo que existen y están reportadas en las líneas celulares de CCR en estadio pre-metastásico, metastásico *in situ* y metastásico invasivo, se procedió a buscar la información en la base de datos de la ATCC (<https://www.atcc.org/products/tcp-1007>) y en la base de datos del banco de células Taiwanés Igrcid (http://igrcid.ibms.sinica.edu.tw/cgi-bin/cell_line_view.cgi).

Con el fin de verificar las alteraciones de origen epigenético que tienen las líneas celulares de CCR usada en este estudio, se realizó una búsqueda bibliográfica tanto en bases de datos como literatura científica para verificar parámetros relacionados con MSI, estabilidad de microsatélites (MSS), CIN y CIMP.

6.4 Análisis *in silico* de las propiedades fisicoquímicas y farmacología de las SCAFs y SCAs no F

Con el fin de obtener información acerca de algunos parámetros fisicoquímicos tales como masa molecular (mw), número de hidrógenos donadores (nHD), número de hidrógenos aceptores (nHA) número de rotaciones (nRot), superficie de área topológica polar (TPSA), logaritmo de la solubilidad acuosa (LogS), coeficiente de partición Log de octanol/agua (LogP) y LogP a pH fisiológico 7,4 (LogD), así como también la verificación de propiedades en química medicinal como el cumplimiento de las 5 reglas de Lipinsky y las reglas de Veber, (Roche et al., 2020) y la capacidad de las SCAF y SCA no F para atravesar o no la barrera hematoencefálica, se usaron dos plataformas de acceso libre SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) y ADMETLab2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com>) (Lagorce et al., 2017).

6.5 Evaluación *in vitro* y *ex vivo* de la citotoxicidad de las SCAFs y SCAs no F

La actividad citotóxica de las SCAF y SCA no F se evaluó en células SW48, SW620, SW948, Detroit 551, CMSP y TCRM según la viabilidad vs. mortalidad de las células, con 6 diluciones seriadas 1:2 en concentraciones que fueron desde los 100 µg/mL hasta 3,125 µg/mL; luego de la exposición a cada compuesto, se determinó la viabilidad celular con el método de MTT (Bromuro de 3 (4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (WWR chemicals reagents Avantor). Como controles de viabilidad se incluyeron células cultivadas en medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% L- Glutamina 1% y antibióticos 1% no expuestas a ningún tratamiento con SCAF y SCA no F y como control de citotoxicidad se incluyeron células expuestas a 5-Fluorouracil (5-FU) en 7 diluciones seriadas 1:2, concentraciones entre 50 µM hasta 0,625 µM, el cual es uno de los medicamentos quimioterapéuticos usados en el tratamiento del CCR (Flis et al., 2014).

Las células se ajustaron a una concentración de 200.000 células/mL en el respectivo medio de cultivo suplementado, mientras que el TCRM se cortó en trozos de 2x2 mm y se depositaron en medio DMEM

suplementado; en cada pozo de un plato para cultivo celular de 96 pozos (Nunc, Thermo Fischer Scientific) se dispensaron 100 μ L de medio con una concentración de 20.000 células/pozo. Transcurridas 12 h de haber sembrado la monocapa se adicionó en cada pozo 100 μ L de dilución de cada compuesto según las concentraciones indicadas anteriormente; los platos se incubaron a 37°C sin CO₂ para las células SW Dadas las condiciones descritas por la casa productora de las células ATCC quien sugiere el cultivo de las mismas con el medio Leibwovitz L-15 y sin flujo de CO₂ y con 5% de CO₂ para las células Detroit 551, CMSP y TCRM. Luego de incubar por 72 h, se evaluó el efecto de los compuestos con el ensayo de MTT, adicionando 30 μ L/pozo del reactivo en una concentración de 5 mg/mL dejando a 37°C durante 3 h protegido de la luz. Después de este tiempo se adicionó 100 μ L/pozo de DMSO con el fin de solubilizar los cristales de formazán formados. La densidad óptica (DO) de la reacción colorimétrica producida por la formación del formazán fue medida a 570-595 nm en un lector de platos Varioskan (Thermo). La absorbancia inespecífica se corrigió restando la DO de las soluciones blanco que correspondían a los respectivos medios de cultivo suplementados (L-15, RPMI 1640 o DMEM) y DMSO al 0.5%. Cada concentración de las sales, así como de los controles se evaluaron por duplicado en cuatro experimentos diferentes.

Con las DO netas obtenidas se calcularon los porcentajes de viabilidad (Eq. 1) y mortalidad (Eq. 2):

$$\% Viability = (OD \text{ treated cell} \div OD \text{ non treated cells}) \times 100$$

(1)

$$\% Mortality = 100 - \% Viability$$

(2)

Los resultados se expresaron como la Concentración citotóxica media 50 (CC₅₀), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50% de la muerte celular. Los datos de % de mortalidad para cada compuesto y concentración evaluada se registraron en una base de datos y se calculó la CC₅₀ usando el software GraphPad Prism 7 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.), aplicando un método

paramétrico de regresión no lineal que permite el análisis de la relación dosis-respuesta del logaritmo de la variable dependiente (Upegui Zapata et al., 2020).

La actividad citotóxica de los compuestos SCAF y SCA no F evaluados se clasificó como alta, moderada o baja según los valores de CC_{50} obtenidos para el compuesto 5-FU, el medicamento usado para el tratamiento de CCR, así: citotoxicidad alta para valores de $CC_{50} \leq 30 \mu\text{M}$, moderada para valores de $CC_{50} \geq 31$ y $< 150 \mu\text{M}$ y baja para valores $\geq 151 \mu\text{M}$.

Adicionalmente para cada compuesto se calculó el índice de selectividad (IS) entre células no tumorales y tumorales que corresponde al cociente obtenido luego de dividir el valor de CC_{50} generado para la línea celular de fibroblastos de piel Detroit 551, tejido de colon murino y CMSP y el valor de CC_{50} obtenido para las células de CCR. Además, se calculó el IS entre células pre-metastásicas y células metastásicas *in situ* e invasivas y que corresponde al cociente obtenido luego de dividir el valor de CC_{50} obtenido en la línea de CCR pre-metastásico por el valor de CC_{50} obtenido para las células con fenotipo metastásico *in situ* y metastásico invasivo.

Por último se evaluó de manera cualitativa el efecto citopático (ECP) generando una escala de rangos que van desde bajo (+), medio (++) y elevado (+++), según lo observado en los cultivos antes de iniciar los ensayos de MTT, basado en el desprendimiento de las monocapas, que sugiere muerte del cultivo dado posiblemente al efecto citotóxico generado por la inducción de las SCAs.

6.6 Efecto de las SCAF 5, 11 y 13 en sobre el ciclo celular, fragmentación del ADN, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e integridad de la membrana plasmática

Los análisis de citometría de flujo se realizaron con las SCAF con códigos **5, 11 y 13** debido a que tuvieron el mejor desempeño global en los análisis de citotoxicidad realizados previamente. El efecto de las SCAF **5, 11 y 13** en el ciclo celular y fragmentación del ADN de las células SW48, SW620,

SW948 y Detroit 551, se evaluó mediante la técnica de citometría de flujo. Brevemente; en cada pozo de un plato de 24 pozos se dispensaron a una concentración de 1×10^5 células/mL de medio de cultivo, a las cuales se adicionaron los compuestos **5**, **11** y **13** por separado. Cada compuesto se evaluó a dos concentraciones equivalentes a la CC_{50} y la $CC_{50/2}$, así: $13 \mu\text{M}$ y $26 \mu\text{M}$ para el compuesto **5**, $11 \mu\text{M}$ y $22 \mu\text{M}$ para el compuesto **11** y $7,5 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$ para el compuesto **13**. Los platos se incubación durante 8 h. Pasado este tiempo, se desprendieron las células de manera mecánica con el embolo de una jeringa de insulina y las células recolectadas en tubos para citometría fueron fijadas con etanol al 95% y se almacenaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ toda la noche. Las células se lavaron e incubaron en $400 \mu\text{L}$ de solución que contenía yoduro de propidio (PI) a concentración de $50 \mu\text{g/mL}$, RNasa A [$100 \mu\text{g/mL}$], EDTA [50 mM] y Triton X-100 [0.2%] durante 30 min. a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, la suspensión celular se analizó para determinar la fluorescencia del PI con el fin de verificar la fragmentación del ADN celular en un citómetro BD LSR Fortessa™, (Becton Dickinson BD Biosciences, San Diego, CA USA). Los datos se obtuvieron utilizando el software de análisis de datos FlowJo 7.6.2 (FlowJo, USA). Las células que se encuentran en sub-G1 se utilizaron como marcador de muerte (fragmentación del ADN). Para el análisis del ciclo celular, la población sub-G1 se restó del total de eventos adquiridos y se realizó el análisis de Dean Jett Fox ($\text{RMS} < 10$).

Para determinar el efecto en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) las células desprendidas de la monocapa y en un tubo de citometría se lavaron en $100 \mu\text{L}$ de líquido envolvente BD™ FACSFlow™ y tiñeron con PI a una concentración final de 12.5 ng/mL y el colorante catiónico lipofílico yoduro de 3,3'-Dihexiloxacarbocianina (DIOC-6) en una concentración final de 40 nM (ThermoFisher scientific). Las células se incubaron en la oscuridad por 20 min. El $\Delta\Psi_m$ se midió mediante la retención celular de DIOC-6 (Maritza et al., 2018), que es captado selectivamente por las mitocondrias activas y refleja el estado de este ($\lambda \text{ ex. } 450\text{--}490 \text{ nm}$, $\lambda \text{ em. } 515 \text{ nm}$) (Calvo-Alvarez et al., 2021). Los datos fueron obtenidos en el citómetro LSR Fortessa™, (Becton Dickinson BD Biosciences, San Diego, CA USA) y se adquirieron 10.000 eventos para su análisis utilizando el software FlowJo v. 7.6.2 (FlowJo,USA). Los resultados se analizan según los siguientes parámetros que se describen el a siguiente figura;

Q1: DIOC-6(-)/PI(+) MUERTE
Q2: DIOC-6(+)/PI(+) $\Delta\Psi_m(+)$
Q3: DIOC-6(+)/PI(-) VIVAS
Q4: DIOC-6(-)/PI(-) $\Delta\Psi_m(-)$

| | | |
|-----------------------------|--|---|
| (+) PI | Q1: (-) DIOC-6 (+) PI Muertas | Q2: (+) DIOC-6 (+) PI $\Delta\Psi_m (+)$ hiperpolarizadas |
| | Q4: (-) DIOC-6 (-) PI $\Delta\Psi_m (-)$ hipopolarizadas | Q3: (+) DIOC-6 (-) PI Vivas |
| | (-) DIOC-6 | (+) |

Figura 12. Cuadro de dialogo de los resultados que se pueden derivar del ensayo de evaluación de la integridad de la membrana plasmática y potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).

Por último, para identificar la exposición de la Fosfatidil serina (PS) en las líneas celulares tratadas con las SCAFs **5**, **11** y **13**, las células desprendidas de la monocapa y en un tubo de citometría se lavaron y re suspendieron en 100 μL de líquido envolvente BD™ FACSFlow™ y se tiñeron con 50 μL de Anexina (1 mg/mL) y 2 μL de PI (1 mg/mL) (ThermoFisher scientific), las células se incubaron en la oscuridad por 10 min. Los datos fueron obtenidos de nuevo en el citómetro (LSR Fortessa™, Becton Dickinson BD Biosciences, San Diego, CA USA) contando 10.000 eventos, y analizados utilizando el software FlowJo v. 7.6.2 (FlowJo,USA). Los resultados se analizan según los siguientes parámetros que se describen el a siguiente figura;

Q1: Anexina-V (-)/PI(+) daño en membrana
Q2: Anexina-V (+)/PI(+) MUERTE “necrosis”
Q3: Anexina-V (+)/PI(-) MUERTE “apoptosis”
Q4: Anexina-V (-)/PI(-) VIVAS

| | | |
|--------------------------|--|--|
| (+) | Q1: (-) Anexina-V (+) PI Daño en membrana | Q2: (+) Anexina-V (+) PI Muertas por necrosis |
| | Q4: (-) Anexina-V (-) PI Vivas | Q3: (+) Anexina-V (-) PI Muerte por apoptosis |
| (-) Anexina-V (+) | | |

Figura 13. Cuadro de dialogo de los resultados que se pueden derivar del ensayo de evaluación de la exposición de fosfatidil serina en la membrana plasmática y evaluación de la muerte por apoptosis.

6.7 Análisis estadístico para ensayos de citotoxicidad, viabilidad celular, ciclo celular e integridad de la membrana celular

Todos los ensayos se realizaron por duplicado en al menos tres experimentos independientes. Para las comparaciones entre grupos de tratamiento se realizó un análisis de varianza ANOVA de una o dos vías con una prueba post hoc de Tukey o Dunnet con múltiples tratamientos después de confirmar la distribución normal de los datos, calculado en el software científico GraphPad Prism 7 (GraphPad, Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.) se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$ (*), $< 0,01$ (**) y $< 0,001$ (***) (Egorova et al., 2015; Upegui Zapata et al., 2020).

6.8 Análisis metabolómicos en líneas celulares de CCR SW620

Previamente se realizó un ensayo para estandarizar las condiciones para el análisis metabolómico que permitió diseñar el protocolo de extracción de metabolitos que pertenecen exclusivamente al endometaboloma celular y que se describe a continuación. *Nota: Para más detalles correspondientes a los ensayos pilotos ver el Anexo 1.*

6.8.1 Cultivo y tratamiento de las células SW620 con las SCAF 11 y 13

Para los ensayos de metabolómica se sembraron las células SW620 a una densidad de $1,8 \times 10^6$ cel/mL en platos de cultivo de 5 cm de diámetro recubiertas con poli-lisina para mayor adherencia y se mantuvieron por separado las demás condiciones del cultivo que se describieron con anterioridad en este documento en el apartado de cultivo de líneas celulares y condiciones de cultivo (6.2). Luego de 12 h de tratamiento de las células SW620 con las SCAF **11** y **13** se verificó la presencia de la monocapa de células. Posteriormente la línea celular, fue tratada con los compuestos: SCAF **11** ($C_{6lm}CF_3$) y **13** ($C_{6lp}CF_3$) a las concentraciones de CC_{50} 22 y 15 μ M respectivamente. Como control del ensayo, se dejaron las células sin tratamiento, pero con DMSO al 2% (vehículo donde se solubilizaron las SCAF) y con el medio de cultivo completo. Todas las cajas se incubaron por 8 h. Se realizaron 5 réplicas biológicas de manera independiente para cada línea celular en cada una de las condiciones anteriormente mencionadas. Las células fueron desprendidas de la monocapa de manera mecánica con cell scraper (raspador de células), evitando el uso de tripsina (Naba et al., 2015).

6.8.2 Quenching y extracción de metabolitos

Con el objetivo de obtener información con respecto a los metabolitos que se generaron tras la exposición de las células SW620 a las SCAFs **11** y **13** se asignaron los siguientes grupos de análisis: G6: células SW620 no tratadas, G7: células SW620 tratadas con SCAF **11** y G8: células SW620 tratadas con SCAF **13**. Inicialmente se retiraron 5 mL del medio de cultivo con o sin compuestos de los platos de cultivo con una micropipeta, verificando que no hubiera quedado ningún residuo del medio de cultivo en ellas, y de inmediato se depositaron las cajas de Petri en cama de hielo seco; rápidamente se adicionaron 1mL a cada caja una solución pre-enfriada a $-20^{\circ}C$ conteniendo 80% de metanol (MeOH) y 20% de agua miliQ. Como estándar interno se utilizó Aldonitol o Ribitol (Sigma-Aldrich CAS: 488-81-3), en una concentración de 10 μ g/mL o 25 μ M, respectivamente. Luego se desprendieron las células de las monocapas con ayuda de raspadores de monocapas celulares; las células en suspensión se recuperaron con la ayuda de una micropipeta de 1000 μ L y transfirieron a crioviales de 2 mL pre enfriados a $-20^{\circ}C$.

Los crioviales se agitaron en el vórtex por 15 segundos; rápidamente se sumergieron en nitrógeno líquido por 15 segundos y después se pasaron al hielo seco para descongelar entre 30 a 60 segundos; por último, se sonicaron durante 5 min en agua fría con hielo seco sumergido. Todos los pasos se repitieron 4 veces. Finalmente, las muestras se transfirieron a tubos cónicos de 1,5 mL y se centrifugaron a 20.000 x g x 15 min a 4°C. Por último, se llevaron los sobrenadantes a crioviales de 2 mL y se almacenaron a -80°C hasta su preparación para análisis por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas LC-MS en el laboratorio MetCore (Universidad de los Andes, Bogotá-Colombia).

6.8.3 Análisis de metabolómica no dirigida

Para realizar el análisis metabolómico, 200 µl de cada uno de los extractos anteriormente preparados fueron llevados a sequedad en el equipo *speedVac* durante 4 h a 35 °C. Los extractos secos fueron reconstituidos con 100 µl de metanol (MeOH) los cuales se utilizaron para los análisis posteriores por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (LCMS-QTOF).

Con el fin de determinar si los procesos llevados con anterioridad tales como cultivo celular, adición de los compuestos SCAF 11 (C_6ImCF_3) y SCAF 13 (C_6IpCF_3) y la subsecuente extracción de metabolitos y verificar que se generaron unos modelos de información fiable, se realizaron los análisis estadísticos multivariados de validación cruzada tales como PCA (Principal Component Analysis) y OPLS-DA (Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis), con el fin de obtener diferencias entre los grupos G6, G7 y G8 en relación a los metabolitos arrojados para cada grupo.

6.8.3.1 Preparación de los controles de calidad (CC o QC)

Para evaluar la fiabilidad de la preparación de las muestras y la estabilidad en cada plataforma analítica se prepararon muestras de control de calidad mezclando cantidades iguales del extracto metabólico de cada muestra de la siguiente manera: se tomaron 50 µL de cada una de las muestras almacenadas a -80°C y se mezclaron todas en un vial de LC-MS de 5 mL; luego se tomaron alícuotas de 100 µL y se trasvasaron a tubos cónicos de 2,0 mL que se almacenaron a -80°C por 24 h

adicionales. Posteriormente se analizó un QC tomado de forma aleatorio cada 6 muestras bajo los parámetros cromatográficos de las mismas en el análisis multiplataforma (RP-LC/ -QTOF-MS y HILIC-LC-MS), que se detallarán más adelante.

6.8.3.2 Metabolómica no dirigida por RP-LC/ -QTOF-MS

El análisis de las muestras se realizó en el centro de metabolómica MetCore de la Universidad de los Andes mediante cromatografía líquida en fase reversa acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (RP-LC/MS-QTOF).

El análisis de LC/MS se realizó empleando un sistema de cromatografía líquida de alta resolución UHPLC (Agilent 1260 infinity) acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo (Q-TOF 6545) con ionización por electrospray (Agilent technologies, Waldbronn, Germany). El sistema se eluyó varias veces hasta que se estableció el equilibrio para evaluar el proceso analítico utilizado y la reproducibilidad de la preparación de la muestra.

Para la separación de los metabolitos se inyectaron 10 µL de muestra en una columna Infinity Lab poroshell EC-C18 (3.0 x 100 mm, 2.7 µm, Agilent) y guarda columna, los cuales fueron inyectados en una columna InfinityLab Poroshell 120 EC C-18 (3.0 x 100 mm, 2.7 µm, Agilent), junto con un guarda columna EC-C18 (2.1 x 5 mm, 1.9 µm, Agilent), manteniendo una temperatura de 40 °C. La elución se llevó a cabo utilizando una fase móvil compuesta por: (Fase A) 0,1% (v/v) de ácido fórmico en agua y (Fase B) 0,1% (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo, con un flujo de 0,3 mL/min y siguiendo el siguiente gradiente de elución: 0-10,0 min, 5-5% B; 10,0-22,0 min, 5-95 % B; 22,0-24,0 min, 95-95 % B; 24,0-24,1 min, 95-5 % B y 24,1-32,0 min, 5-5%.

Los datos se detectaron en modo centroide a una velocidad de exploración de 1,00 espectro por segundo. Utilizando un rango completo de exploración de 50 a 1100 m/z. Durante todo el análisis se utilizaron masas de referencia para la corrección de masas m/z 121.0509 [purina, (C₅H₄N₄+H)⁺] y m/z 922.0098 [HP-0921, (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄+H)⁺]; en modo positivo (+) y m/z 112.9856 [C₂O₂F₃(NH₄)⁻] y m/z 1033.9881 [C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄]. En modo negativo. Más detalles de las condiciones del análisis se muestran en el anexo 2 (documento adjunto).

Los parámetros de ionización fueron los siguientes: voltaje capilar fijado en 3500 V, caudal de gas de secado de 8 L/min a 325 °C, gas nebulizador a 50 psi, voltaje de fragmentación de 175 V, voltaje del skimmer de 65 V y voltaje de radiofrecuencia octapolar (OCT RF Vpp) de 750 V. Los datos se recopilaban en modo ESI (+) Y (-).

6.8.3.3 Metabolómica no dirigida por HILIC-LC-MS

Las muestras se analizaron utilizando el mismo sistema analítico definido para el estudio metabolómico no dirigido por RP-LC/QTOFMS.

Se inyectaron 2 µL de cada muestra (extracto de metabolitos o QCs) en una columna Kinetex HILIC 100 A (3,0 x 150 mm 2,6 µm, Agilent) con una precolumna EC-18 (2.1 x 5 mm 1 0 0.9 µm, Agilent) a 40 °C. La elución se llevó a cabo utilizando una fase móvil compuesta por: (Fase A) 10 mM acetato de amonio en acetonitrilo:agua (50:50) y (Fase B) 10 mM de acetato de amonio en acetonitrilo:agua (95:5) con un flujo constante de 0,4 mL/min, y un caudal de 0,4 mL/min. El programa de elución en gradiente comenzó a ejecutarse así; 0-15,0 min, 99-50% B; 15,0-16,0 min, 50-50 % B; 16,0-16,1 min, 50-99 % B; y 16,1-22,0 min, 99-99% B.

La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI negativo en full scan de 50 a 1100 m/z. durante todo el análisis para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia las mismas masas de referencia m/z 112.9856 [C₂O₃F₃ (NH₄)] Y m/z 1033.9881 (C₁₈H₈O₆N₃P₃F₂₄)

Más detalles de las condiciones del análisis se muestran en el anexo 3 del documento adjunto

6.8.3.4 Procesamiento y análisis de datos

El análisis de los datos estuvo precedido por las etapas de preprocesamiento de los datos, pretratamiento de los datos y finalmente el tratamiento de los datos.

Los datos LC-QTOF-MS se analizaron utilizando el software Agilent Mass Hunter profinder 10.0, que emplea algoritmos como extracción de características moleculares y extracción de características recursivas para deconvolución, alineación, e integración. Posteriormente, los datos sin procesar se inspeccionaron manualmente para eliminar cualquier ruido de fondo y ajustar la integración de la señal. Para garantizar la calidad de los datos, solo se retuvieron los metabolitos presentes en al menos el 80% de las muestras de control de calidad. Este proceso de filtrado fue esencial para mejorar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

A los datos generados del análisis por LC-QTOF-MS en las dos polaridades, se les realizó un procesamiento empleando el software agilent MAss Hunter Profinder B.10.0, que emplea algoritmos como la extracción de características moleculares y la extracción recursiva de características para la deconvolución, alineación, y la integración. La evaluación de los datos y la obtención de la matriz cruda para su posterior análisis estadístico fue realizada con los datos brutos que fueron inspeccionados usando el software Agilent Masshunter Profinder B 10.0 (Santa Clara, California USA), empleando el algoritmo Recursive Molecular Extraction para la deconvolución, alineación del cromatograma e integración de las características moleculares presentes en las muestras y en el blanco de solvente de acuerdo con la masa y el tiempo de retención.

Posteriormente, los datos brutos se inspeccionaron manualmente para eliminar cualquier ruido de fondo y ajustar la integración de la señal. Luego, se realizó una alineación del tiempo de retención en el software Agilent Mass Profiler Professional B.15.0 y los resultados se exportaron al software Agilent MassHunter Quantitative B.10.0 para la integración de datos. Los datos obtenidos en cada plataforma se exportaron a Excel para filtrarlos por presencia y reproducibilidad manteniendo los metabolitos presentes en al menos 80% de las muestras con un coeficiente de variación (CV) menor al 20 % en las muestras de control de calidad garantizando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. Los datos se filtraron por altura de pico, por tiempos de retención de señal, relación m/z e intensidad de la señal. Luego se realizó deconvolución de las señales detectadas a fin de integrar la masa y la información cromatográfica, y obtener la lista de picos o "anotaciones". Posterior a ello se hizo el alineamiento y luego el llenado de huecos o "gap filling", que corresponde a metodologías estandarizadas en análisis multivariados que los hace automáticamente y bajo programación de

algoritmos el programa mass hunter de agilent y se confirma con SIMCA, programas que pertenecen al instituto MetCore de la U de los Andes. La normalización o corrección de los errores con el patrón interno, adonitol (10 µg/mL o 25 µM, respectivamente) que se adiciona a cada muestra durante los procesos de homogeneización y preparación de estas. Para las anotaciones de características moleculares estadísticamente significativas se realizaron análisis estadísticos multivariantes (MVA) utilizando SIMCA-P 16.0 (Umetrics).

El análisis estadístico se llevó a cabo en el software MetaboAnalys 6.0 a partir de la matriz de datos generada y se realizó normalización por suma y escaldado de Pareto con el fin de centrar los datos. Después del preprocesamiento y pretratamiento de los datos, se utilizó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar la calidad de los datos adquiridos y evaluar la reproducibilidad del sistema cromatográfico. Posteriormente se construyeron modelos de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) con un nivel de confianza del 95 % que representan las distribuciones normales multivariadas con las covarianzas de las muestras para cada clase. Se hicieron las respectivas validaciones de cada modelo haciendo una validación cruzada de los datos y un análisis de 100 permutaciones (Thévenot et al., 2015) Este análisis estadístico permitió identificar diferencias significativas en los perfiles metabolómicos entre los grupos de estudio y garantizar la fiabilidad y reproducibilidad de los resultados.

6.8.3.5 identificación de metabolitos estadísticamente significativos e interpretación biológica de los resultados

Para la identificación de metabolitos significativos, inicialmente, las anotaciones obtenidas se sometieron a una identificación putativa basada en la correspondencia de la masa exacta observada de cada compuesto con los valores m/z disponibles en las bases de datos en línea como METLIN (<http://metlin.scripps.edu>), KEGG (<http://genome.jp/kegg>), y LIPIDMAPS (<http://lipidMAPS.org>), utilizando el anotador CEU Mass Mediator (<http://ceumass.eps.uspceu.es>). Posteriormente se utilizó el software de análisis cualitativo Agilent MassHunter para generar la fórmula química de cada m/z a partir de los datos MS1. Para validar la identidad de los metabolitos, se comparó la MS2 obtenida con varias bases de datos, incluyendo el software MS Dial 4.80

(<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html>) y Lipid annotator (<https://www.agilent.com/en/solutions/omics/lipidomics/lipidomics-data-analysis>). Se asignó un nivel de identificación a cada metabolito según lo definido por (Ding et al., 2021; Fiehn et al., 2008).

Para la identificación de las rutas metabólicas alteradas se utilizó el programa MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) que permite el análisis de rutas bioquímicas al ingresar tanto códigos HMDB como los códigos KEGG, obtenidos a partir de los listados VIP's de los modelos OPLS-DA para los diferentes grupos de comparaciones. Por último, se realizó un análisis de enriquecimiento aumentando la confiabilidad de la información obtenida con respecto a los metabolitos diferenciadores entre las comparaciones y las vías metabólicas en que éstos participan (Marco-Ramell et al., 2018).

7. Resultados

7.1 Análisis bioinformático y bibliográfico de los cambios genéticos presentes en las células de CCR

Se identificaron 8 genes mutados en las líneas celulares de CCR: *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4*, *CTNNB1*, *EGFR* y *FBXW7*, los cuales se encuentran identificados en la base de datos del NIH en el proyecto the Cancer Genome Atlas (TCGA) (www.portal.gdc.cancer.gov) y que están relacionados en eventos de regulación génica, proliferación celular, angiogénesis y metástasis, que al estar mutados generan alteraciones en el ciclo celular y proliferación sin control (Tabla 3). Solo el gen TP53 está mutado en las tres líneas celulares indicando un patrón de transformación neoplásica clásico en líneas celulares cancerosas. Las células pre-metastásicas SW948 comparte con las células metastásicas invasivas SW620 mutaciones en los genes *KRAS*, *APC* y *PIK3CA*. Notoriamente, las células SW48 presentan mutaciones en los genes *CTNNB1*, *EGFR* y *FBXW7* que no están presentes en las células SW48 (pre-metastásicas) y SW620 (fenotipo metastásico invasivo). La figura xxx muestra un modelo de avance de las etapas que representan cada una de las líneas celulares y las mutaciones que corresponde a cada una de ellas según lo encontrado en las bases de datos.

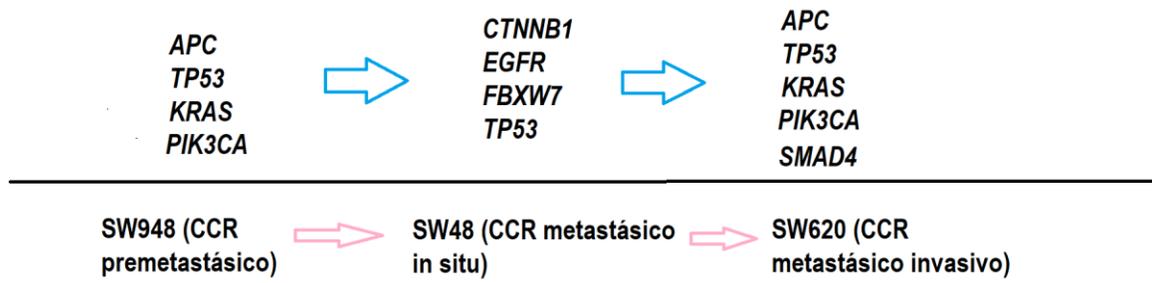


Figura 14. Modelo gráfico de la progresión tumoral y mutaciones observadas en cada línea celular.

Tabla. 3. Alteraciones genéticas de las líneas celulares de cáncer colorrectal SW948, SW48 y SW620.

| Linea celular | Gene mutado | Proteína codificada | Función | Cigocidad | Nucleótido alterado | Mutación en la proteína | Plataforma | |
|---------------|----------------------------|-----------------------------------|--|-----------------|---------------------|-------------------------|------------|------------|
| | | | | | | | ATCC | IGRhCellID |
| SW948 | <i>KRAS</i> | K-Ras | Proliferación celular y diferenciación | Heterocigoto | 182A>T | Q61L | x | x |
| | <i>PIK3CA</i> | p110 alpha (p110α) protein | Proliferación celular y migración | Heterocigoto | 1624G>A | E542K | x | x |
| | <i>APC</i> | APC protein | Supresor tumoral | Heterocigoto | 3340C>T | R1114* | x | x |
| | | | | Heterocigoto | 4285C>T | Q1429* | x | x |
| <i>TP53</i> | Tumor protein 53 | Supresor tumoral | ND | 412 stop at 122 | G117FS | - | x | |
| SW620 | <i>KRAS</i> | K-Ras | Proliferación celular y diferenciación | Homocigoto | 35G>T | G12V | - | x |
| | | | | Heterocigoto | 182A>T | Q61L | - | x |
| | <i>TP53</i> | Tumor protein 53 | Supresor tumoral | Homocigoto | 818G>A | R273H | - | x |
| | | | | Homocigoto | 925C>T | P309S | - | x |
| | | | | ND | 881G>A | R273H | - | x |
| | | | | ND | 988C>T | P309S | - | x |
| | <i>APC</i> | APC protein | Supresor tumoral | Homocigoto | 4012C>T | Q1338 | - | x |
| | | | | Heterocigoto | 3340C>T | R1114* | - | x |
| | | | | Heterocigoto | 4285C>T | Q1429* | - | x |
| | <i>SMAD4</i> | TGFB | Supresor tumoral | Homocigoto | 5G>C | - | - | x |
| <i>PIK3CA</i> | p110 alpha (p110α) protein | Proliferación celular y migración | Heterocigoto | 1624G>A | E542K | - | x | |

| | | | | | | | | |
|------|---------------|---|--|--------------|----------|-----------|---|---|
| SW48 | <i>CTNNB1</i> | β -catenin | Proliferación celular y diferenciación | Heterocigoto | 98C>A | S33Y | x | x |
| | <i>EGFR</i> | epidermal growth factor receptor | Proliferación celular y supervivencia | Heterocigoto | 2155G>A | G719S | x | x |
| | <i>FBXW7</i> | F-box and WD repeat domain-containing 7 | Familia de proteínas F-box | Heterocigoto | 2001delG | S668fs*39 | x | - |
| | <i>TP53</i> | Tumor protein 53 | Supresor tumoral | ND | 805C>T | Arg248Trp | - | x |

Datos extraídos de The Cancer Genome Atlas (TCGA) en la base de datos de los NIH (www.portal.gdc.cancer.gov), la American Type Culture Collection - ATCC (<https://www.atcc.org/>), y el IGRhCellID (<http://igrcid.ibms.sinica.edu.tw>). *KRAS*: Oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten; *PIK3CA*: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa subunidad catalítica alfa; *APC*: poliposis adenomatosa coli; *TP53*: proteína tumoral p53; *SMAD4*: Madres contra el homólogo decantaplejico 4; *CTNNB1*: beta-1 Catenina; *EGFR*: receptor del factor de crecimiento epidérmico; y *FBXW7*: F-Box And WD Repeat Domain Containing 7.

7.2 Análisis bioinformático de las líneas celulares de CCR

A partir de la revisión bibliográfica se consolidaron los datos relacionados con los parámetros genéticos y epigenéticos tales como MSI, MSS, CIN y el perfil metilador de islas CpG (CIMP) (Tabla 4). Se observó que la línea celular SW48 tiene un estado de MSI a diferencia de la línea celular SW620 que tiene MSS; sin embargo, ambas son positivas para los genes evaluados en los paneles CIMP1 panel 1/Issa que consiste en los siguientes genes: *CDKN2A(p16)*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* and *MLH1*. Por su parte, el CIMP2 panel 2/Weisenberger consiste en los siguientes genes: *CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1*. Se sugiere que si hay al menos 3 genes metilados en el panel 1 el resultado será positivo para este panel, mientras que en el panel 2 debe tener mínimo dos genes metilados para considerar el panel positivo (Flatin et al., 2021). Por último, la línea celular SW948 presenta estatus MSI únicamente.

Tabla 4. Relación de MSI y estado de CIMP y CIN en las líneas celulares SW48, SW620 y SW948.

| Cell Line | MSI status | CIMP panel 1 | CIMP panel 2 | CIN |
|-----------|---------------|--------------|--------------|-----|
| SW48 | MSI+ | + | + | - |
| SW620 | Stable (MSS)* | + | + | - |
| SW948 | MSI+ | ND | ND | ND |

Estado de inestabilidad/estabilidad de microsatélites en las líneas celulares SW948, SW48 y SW620 de CCR. CIN: vía de inestabilidad cromosómica; MSI: inestabilidad de microsatélites; MSS: estabilidad de microsatélites; CIMP: fenotipo metilador de islas CpG; panel 1 (*CDKN2A(p16)*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT31* y *MLH1*); panel 2 (*CACNA1G*, *IGF2*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1*); ND: no hay datos disponibles. La información se tomó de la plataforma Cellusaurus (www.expasy.org).

7.3 Citotoxicidad de SCAF y SCA no F

Los resultados de citotoxicidad de 14 SCAF y 2 SCA no F frente a tres líneas celulares de CCR se muestran en la Tabla 5, en donde el nombre del compuesto estudiado se indica en la primera columna

(los compuestos **1- 16** y el compuesto de referencia 5-FU). Las columnas segunda, tercera y cuarta contienen valores CC_{50} de los compuestos frente a las líneas CCR SW48, SW948 y SW620 respectivamente. Los resultados cualitativos del ECP en estas líneas también se tabulan entre paréntesis. La Tabla 5 también contiene los valores de CC_{50} frente a tres líneas de diferentes orígenes: fibroblastos de piel Detroit 551 (quinta columna), TCRM (sexta columna) y CMSP (séptima columna). Se construyó una representación gráfica (Figura 15) a partir de los datos de la Tabla 5.

La Tabla 5 (segunda columna) y la Figura 15 muestran que los SCAF tiene una citotoxicidad que va de moderada a alta para la línea SW48 de cáncer colorrectal *in situ*, con valores de CC_{50} que oscilan entre 125,3 y 16,3 μM . Las SCAF **11, 13 y 14** son ligeramente más citotóxicos que el 5-FU de referencia con valores de CC_{50} muy similares entre sí dentro del error experimental (valores de CC_{50} de 27,9 μM , 22,1 μM , 18,5 μM y 16,3 μM para 5-FU, **11, 14 y 13**, respectivamente. Tanto el 5-FU como las sales **11, 13 y 14** tuvieron un fuerte ECP (representado por +++), al igual que los SCAF **5 y 12**.

En la tabla 5 (cuarta columna) y la Figura 15b, se observa que para la línea de cáncer colorrectal pre-metastásico SW948, las SCAF presentan valores que van desde moderado a altamente citotóxicos con valores de CC_{50} que van desde 211,2 μM a 13,4 μM . En este caso, siete SCAF (**7-13**) son ligeramente más citotóxicos que el 5-FU de referencia, siendo los valores de CC_{50} muy similares entre sí dentro del error experimental (en su orden respectivo, valores de CC_{50} de 26,9 μM , 25,0 μM , 21.5 μM , 20.4 μM , 20.0 μM , 20.0 μM y 13.4 μM para 5-FU, **13, 12, 11, 8, 7, 9 y 10**, respectivamente. Nuevamente, las siete sales más citotóxicas junto con 5-FU mostraron un fuerte efecto citopático (marcado como +++ en la Tabla 5).

En el caso de las células CCR SW620 metastásicas en nódulo linfático, se observó en la Tabla 5 (tercera columna) y en la Figura 15c que las SCAF presenta una citotoxicidad de moderada a alta con valores de CC_{50} que van desde 157.5 μM a 14.5 μM . Las SCAF **2, 5, 8 y 10-14** son ligeramente más citotóxicos que el 5-FU de referencia, con valores de CC_{50} muy similares entre sí dentro del error experimental (en su orden respectivo, valores de CC_{50} de 30,3 μM , 28,1 μM , 24,5 μM , 19,2 μM , 18,8 μM , 18,1 μM , 16,0 μM , 15,1 μM y 14,5 μM para 5-FU, **2, 5, 8, 10, 11, 13, 12 y 14**). Al igual que el

comportamiento en las otras líneas de cáncer estudiadas, los SCAF más citotóxicas también son altamente citopáticos (etiquetados como +++) y 5-FU.

En cuanto a la citotoxicidad frente a células sanas, la Tabla 5 contiene los valores de CC_{50} para todas las sales estudiadas y el compuesto de referencia 5-FU frente a las líneas Detroit 551, TCRM y CMSP (columnas quinta, sexta y séptima, respectivamente). También se determinó el ECP cualitativo para SCAF **(1-14)** y 2 SCA no F **(15 y 16)** y 5-FU frente a la línea Detroit 551 por ser adherente. Como se muestra, todas las SCAF **(1-14)** exhibieron más citotoxicidad que 5-FU contra las células de Detroit y TCRM. Mientras que CC_{50} para 5-FU contra la línea Detroit 551 es 187,7 μM y 944,7 μM para TCRM, la citotoxicidad de las SCAF estudiadas para la línea Detroit cae en el rango de 37,7 μM a 7,8 μM , y de 419,4 μM a 93,5 μM para TCRM. Sin embargo, en el caso de las células CMSP, trece SCAF muestran una citotoxicidad comparable con respecto al compuesto de referencia 5-FU (con valores de CC_{50} que oscilan entre 29,3 y 46,3 μM frente a 38,7 μM para 5-FU). Tres SCAF **(10, 13 y 14)** se ubicaron dentro del rango de menor citotoxicidad, con valores de CC_{50} de 51,4 μM , 53,9 μM y 93,2 μM , respectivamente figuras 15d, e y f.

Por su parte los compuestos SCA no F **15 y 16** produjeron un efecto citopático bajo (+), en las líneas celulares de CCR SW48, SW620 y SW948 y con valores de CC_{50} de 123,7 μM y 65,2 μM **(15 y 16)** en SW48, 157,5 μM y 72,9 μM (SCA no F **15 y 16**) en SW620, 98,2 y 71,0 (15 y 16) en células SW948 mostrando valores bajos y moderados de citotoxicidad, sin embargo, no tan contundentes como lo observado en las SCAF frente al compuesto de referencia 5-FU para las tres líneas celulares figuras 15a, b y c, mientras que el resultado para la línea celular Detroit 551, estos compuestos mostraron un efecto citopático marcado (++) y valores de 98,2 μM y 71,0 μM (SCA no F **15 y 16**) siendo moderado para el compuesto 15 y alto para el compuesto **16** (Figura 15d).

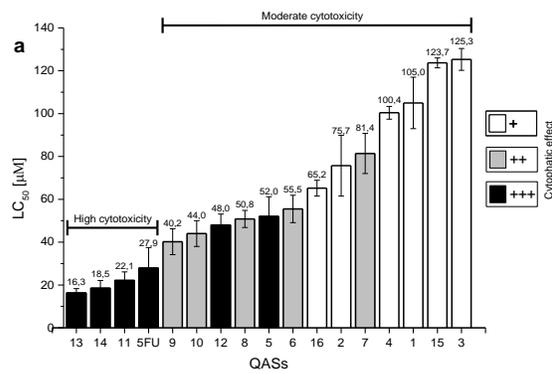
Para los casos de los TCRM y CMSP se observó en la Tabla 5 y en la Figura 15d y 15e respectivamente, que las SCA no F presentan una citotoxicidad variada con valores de CC_{50} que van desde 255,9 μM y 134,9 μM **(15 y 16)** en TCRM siendo potencialmente no tóxicas y por el contrario 93,2 μM y 29,3 μM **(15 y 16)** en CMSP como moderada y altamente citotóxicas en el orden dado.

Tabla 5. Citotoxicidad y efecto citopático de SCAF y SCA no F.

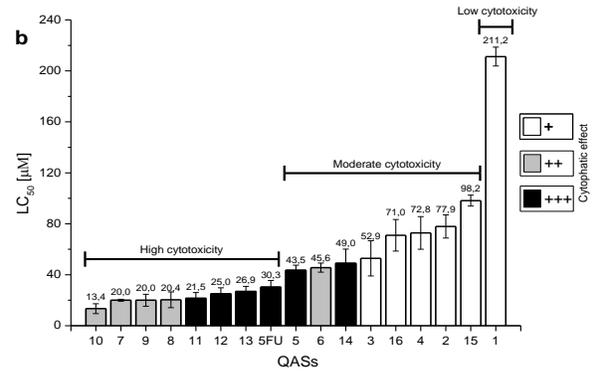
| Code | CC ₅₀ en μ M (ECP ^a) | | | | | |
|------|---|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------|-----------------|
| | SW48 | SW620 | SW948 | Detroit551 | TCRM* | CMSP* |
| 1 | 105,0 \pm 12,0 (+) | 63,7 \pm 15,3 (+) | 211,2 \pm 7,4 (+) | 37,7 \pm 3,2 (++) | 212,0 \pm 4,0 | 29,8 \pm 2,4 |
| 2 | 75,7 \pm 14,2 (+) | 28,1 \pm 6,1 (+) | 77,9 \pm 9,1 (+) | 11,0 \pm 0,5 (++) | 204,7 \pm 14,5 | 35,6 \pm 6,6 |
| 3 | 125,3 \pm 5,1 (+) | 64,5 \pm 8,1 (+) | 52,9 \pm 13,8 (+) | 12,2 \pm 1,8 (++) | 129,7 \pm 20,0 | 39,7 \pm 7,7 |
| 4 | 100,4 \pm 3,0 (+) | 52,5 \pm 5,6 (+) | 72,8 \pm 12,8 (+) | 7,8 \pm 0,5 (++) | 106,8 \pm 4,5 | 45,1 \pm 7,3 |
| 5 | 52,0 \pm 9,2 (+++) | 24,5 \pm 2,3 (+++) | 43,5 \pm 4,0 (+++) | 9,4 \pm 0,7 (+++) | 121,0 \pm 5,4 | 34,8 \pm 6,0 |
| 6 | 55,5 \pm 6,4 (++) | 38,8 \pm 2,1 (++) | 45,6 \pm 3,6 (++) | 8,6 \pm 1,0 (+++) | 129,0 \pm 11,3 | 44,8 \pm 6,4 |
| 7 | 81,4 \pm 9,4 (++) | 31,1 \pm 0,2 (++) | 20,0 \pm 0,8 (++) | 8,9 \pm 2,4 (+++) | 123,2 \pm 9,2 | 46,3 \pm 7,5 |
| 8 | 50,8 \pm 4,0 (++) | 19,2 \pm 3,5 (++) | 20,4 \pm 6,2 (++) | 19,5 \pm 1,2 (+++) | 102,0 \pm 5,0 | 42,3 \pm 9,3 |
| 9 | 40,2 \pm 6,0 (++) | 32,2 \pm 1,0 (++) | 20,0 \pm 4,7 (++) | 15,5 \pm 3,0 (+++) | 206,1 \pm 19,4 | 30,6 \pm 2,1 |
| 10 | 44,0 \pm 6,0 (++) | 18,8 \pm 4,7 (++) | 13,4 \pm 3,9 (++) | 17,9 \pm 3,3 (+++) | 119,4 \pm 8,7 | 51,4 \pm 5,3 |
| 11 | 22,1 \pm 4,0 (+++) | 18,1 \pm 3,7 (+++) | 21,5 \pm 4,5 (+++) | 13,7 \pm 1,0 (+++) | 93,5 \pm 13,9 | 33,4 \pm 2,0 |
| 12 | 48,0 \pm 5,1 (+++) | 15,1 \pm 1,5 (+++) | 25,0 \pm 4,8 (+++) | 13,7 \pm 2,4 (+++) | 110,6 \pm 16,7 | 40,5 \pm 9,5 |
| 13 | 16,3 \pm 2,0 (+++) | 16,0 \pm 1,5 (+++) | 26,9 \pm 4,0 (+++) | 9,7 \pm 1,0 (+++) | >292,7 | 53,9 \pm 3,0 |
| 14 | 18,5 \pm 3,6 (+++) | 14,5 \pm 2,9 (+++) | 49,0 \pm 11,1 (+++) | 10,1 \pm 1,4 (+++) | 419,4 \pm 15,0 | 93,2 \pm 13,1 |
| 15 | 123,7 \pm 2,3 (+) | 157,5 \pm 2,3 (+) | 98,2 \pm 4,3 (+) | 30,9 \pm 2,3 (++) | 255,9 \pm 14,0 | 29,3 \pm 1,4 |
| 16 | 65,2 \pm 3,7 (+) | 72,9 \pm 4,2 (+) | 710 \pm 12,4 (+) | 16,0 \pm 3,0 (++) | 134,9 \pm 11,8 | 38,8 \pm 5,6 |
| 5-FU | 27,9 \pm 9,6 (+++) | 30,3 \pm 6,0 (+++) | 30,3 \pm 5,2 (+++) | 187,7 \pm 0,5 (++) | 944,7 \pm 43,7 | 38,7 \pm 7,0 |

Los datos representan la media +/- DS de tres ensayos independientes con dos réplicas técnicas en cada uno de los análisis de citotoxicidad. SW620: Dukes' type C, colorrectal adenocarcinoma metastásico invasivo; CCR SW48: Dukes' type C, grade IV adenocarcinoma colorrectal metastásico no invasivo; SW948: Dukes' type C, grade III, adenocarcinoma colorrectal pre-metastásico; Detroit 551: fibroblastos normales humanos de piel; TCRM: tejido colorrectal murino sano. CMSP; células mononucleares de sangre periférica. ^aECP: El efecto citopático; bajo (+), moderado (++) y alto (+++). *No se evaluó el ECP en TCRM ni CMSP por ser células no adherentes.

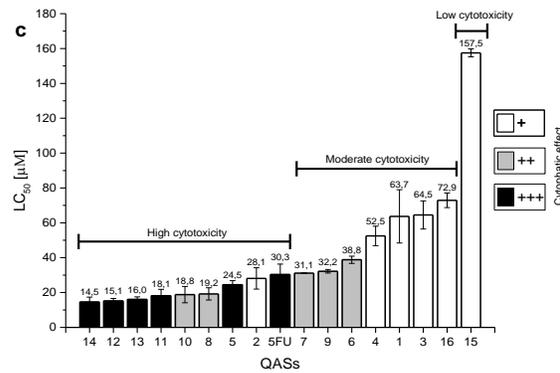
SW48



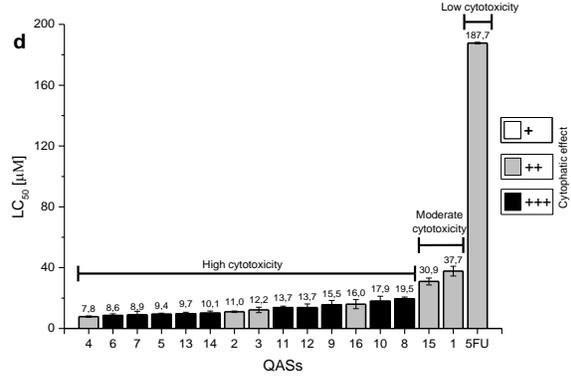
SW948



SW620

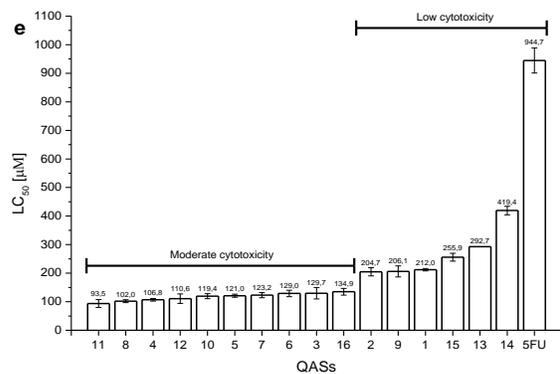


Detroit



551

TCRM



CMSP

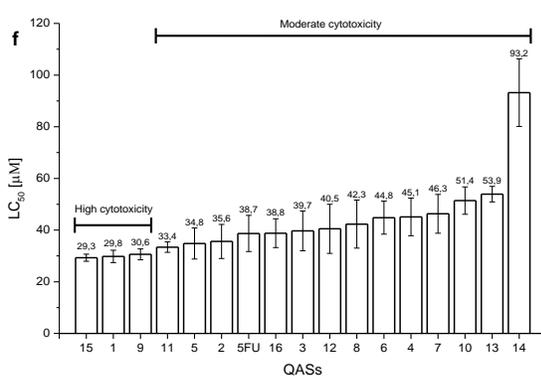


Figura 15. Relación de la citotoxicidad y el efecto citopático de SCAF y SCA no F. (a) SW48 Línea de cáncer colorrectal in situ de grado IV tipo C de Duke's (ATCC® CCL231™) **(b) SW948** Línea de cáncer colorrectal pre-metastásico de grado III tipo C de Duke's (ATCC® CCL237™). **(c) SW620** Línea colorrectal

metastásica de grado IV tipo C de Duke's (ATCC® CCL227™). (d) Línea Detroit 551 (ATCC® CCL110™). (E) Tejido colorrectal murino (TCRM). (F) Células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Efecto citopático ECP: leve (+), moderado (++), fuerte (+++).

Al evaluar la selectividad de los compuestos SCAF y SCA no F mediante el índice de selectividad (IS) arrojado al comparar los valores de CC_{50} obtenidos para la línea celular Detroit 551 de fibroblastos de piel humana normal, TCRM sano y CMSP sanos con los valores de CC_{50} obtenidos para las líneas celulares de CCR SW948, SW48 y SW620 respectivamente, donde los valores de IS mayores a 1 sugieren una selectividad o preferencia de los compuestos en evaluación para eliminar las células tumorales de CCR y no afectar a las células no tumorales, se observó un IS bajo para los compuestos de prueba entre células de CCR y las células Detroit 551, evidenciada por valores de IS que variaron entre 0.1 y 1.3. por el contrario, la selectividad de estos compuestos entre las células TCRM y CRC fue alta, con valores de IS que oscilaron entre 1 y 28,9. Como se esperaba, el compuesto 5-FU mostró selectividad entre las células CRC y Detroit 551 y TCRM sanas con valores > 6 y > 34 , respectivamente tabla 9. A su vez, la selectividad de SCAF y SCA no F entre las células CCR y las CMSP mejoró ligeramente en comparación con las células Detroit, con valores IS que oscilaron entre 0,1 y 6,4; en particular, la selectividad del compuesto 5-FU entre células CMSP y CCR fue baja, con valores de IS entre 1,27 y 1,38, así como este mismo compuesto para la relación entre células TCRM y CRC con valores entre 31,2 y 33,9, sin embargo, no ocurrió lo mismo en la relación de las celdas Detroit 551 y CCR con coeficientes adecuados de IS entre 6.2 a 6.7 (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de selectividad para SCAF y SCA no F para células sanas vs. células de cáncer colorectal.

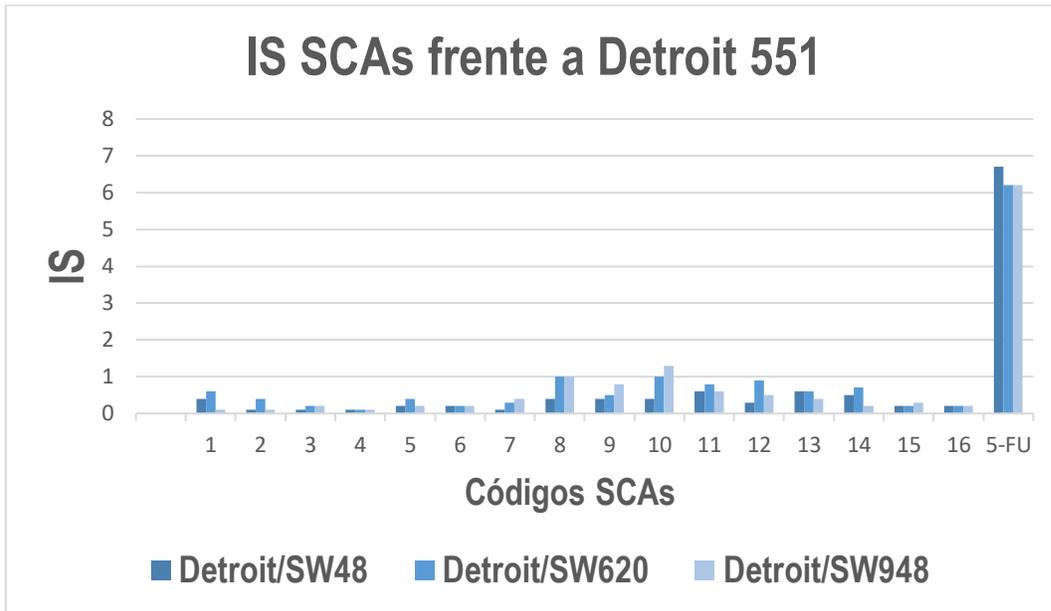
| Codigo | Detroit/S W48 | Detroit/S W620 | Detroit/S W948 | TCRM/ SW48 | TCRM/ SW620 | TCRM/ SW948 | CMSP/ SW48 | CMSP / SW620 | CMSP / SW948 |
|--------|------------------|-------------------|-------------------|---------------|----------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 0,4 | 0,6 | 0,1 | 2,0 | 3,3 | 1,0 | 0,3 | 0,5 | 0,1 |
| 2 | 0,1 | 0,4 | 0,1 | 2,7 | 7,3 | 2,6 | 0,5 | 1,3 | 0,5 |
| 3 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 1,0 | 2,0 | 2,5 | 0,3 | 0,6 | 0,8 |
| 4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 1,1 | 2,0 | 1,5 | 0,5 | 0,9 | 0,6 |
| 5 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 2,3 | 4,9 | 2,8 | 0,7 | 1,4 | 0,8 |
| 6 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 2,3 | 3,3 | 2,8 | 0,8 | 1,2 | 1,0 |
| 7 | 0,1 | 0,3 | 0,4 | 1,5 | 4,0 | 6,2 | 0,6 | 1,5 | 2,3 |
| 8 | 0,4 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 5,3 | 5,0 | 0,8 | 2,2 | 2,1 |

| | | | | | | | | | |
|-------------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| 9 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 5,1 | 6,4 | 10,3 | 0,8 | 1,0 | 1,5 |
| 10 | 0,4 | 1,0 | 1,3 | 2,7 | 6,4 | 8,9 | 1,2 | 2,7 | 3,8 |
| 11 | 0,6 | 0,8 | 0,6 | 4,2 | 5,2 | 4,4 | 1,5 | 1,9 | 1,6 |
| 12 | 0,3 | 0,9 | 0,5 | 2,3 | 7,3 | 4,4 | 0,8 | 2,7 | 1,6 |
| 13 | 0,6 | 0,6 | 0,4 | >18,0 | >18,3 | >10,9 | 3,3 | 3,4 | 2,0 |
| 14 | 0,5 | 0,7 | 0,2 | 22,7 | 28,9 | 8,6 | 5,0 | 6,4 | 1,9 |
| 15 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 2,1 | 1,6 | 2,6 | 0,2 | 0,5 | 0,3 |
| 16 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 2,1 | 1,9 | 1,9 | 0,6 | 0,5 | 0,6 |
| 5-FU | 6,7 | 6,2 | 6,2 | 33,9 | 31,2 | 31,2 | 1,4 | 1,3 | 1,3 |

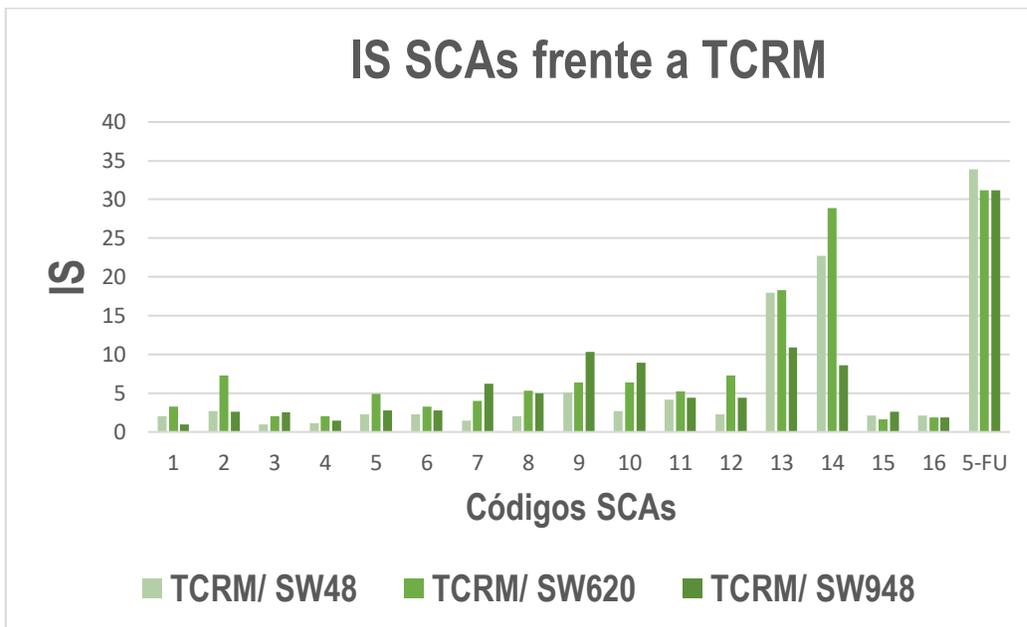
Los datos corresponden a la tasa entre la CC_{50} para células con fenotipo no tumoral Detroit, TCRM, y CMSP y la CC_{50} para células de CCR pre-metastásico SW948 y metastásico *in situ* SW48 o metastásico invasivo SW620. SW620: adenocarcinoma colorrectal metastásico invasivo Tipo C de Duke; SW48: adenocarcinoma colorrectal metastásico no invasivo tipo C, grado IV de Duke; SW948: adenocarcinoma colorrectal pre-metastásico tipo C de Duke, grado III; TCRM: tejido colorrectal murino sano; CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

Al comparar la selectividad de los SCAF y los SCA entre las células de CCR pre-metastásicas frente a las metastásicas *in situ*, los valores de IS de la mayoría de los SCAF fueron < 1,0. Sólo los SCAF **14**, **1** y **13** tuvieron valores de IS de 2,6, 2,0 y 1,7, respectivamente (Tabla 7). De forma similar, la comparación de la selectividad de los SCAF y los SCA entre las células de CCR pre-metastásicas frente a las invasivas mostró que los SCAF **14**, **1**, **2**, **5**, **13**, **12**, **7**, **4** y **11** eran selectivos para las células pre-metastásicas con valores IS de 3,4; 3,3; 2,8; 1,8; 1,7; 1,7; 1,6; 1,4 y 1,2, respectivamente. Como era de esperar, el compuesto 5-FU no mostró selectividad entre las células del CCR con valores cercanos a 1,0 (Tabla 7).

a).



b).



c).

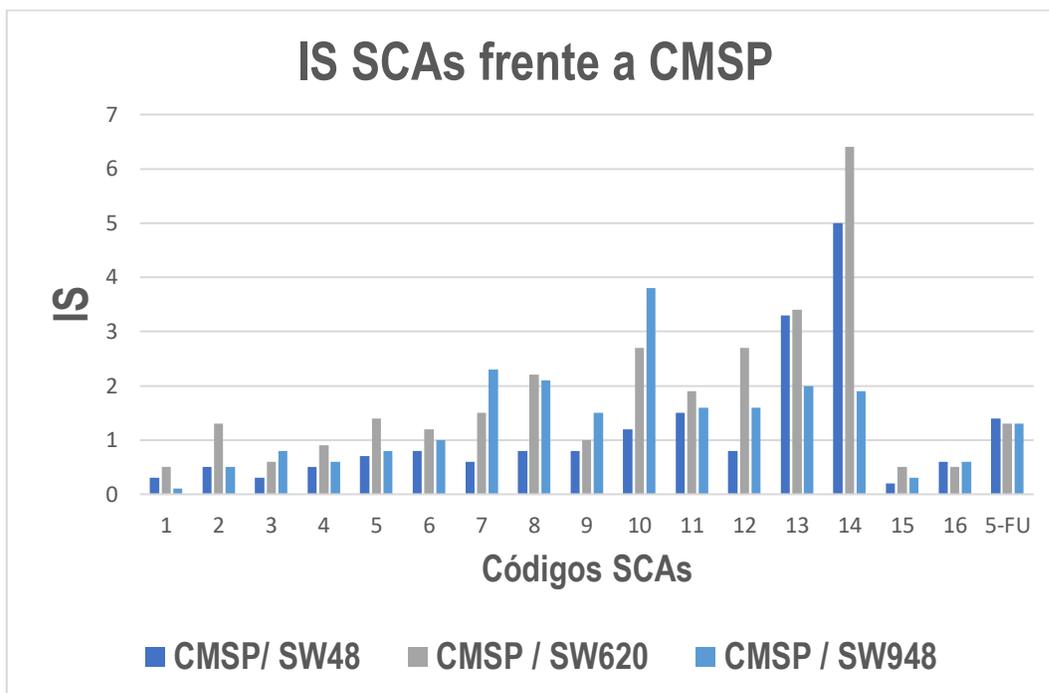


Figura 16. Gráficas del índice de selectividad frente a las células sanas vs células de CCR.

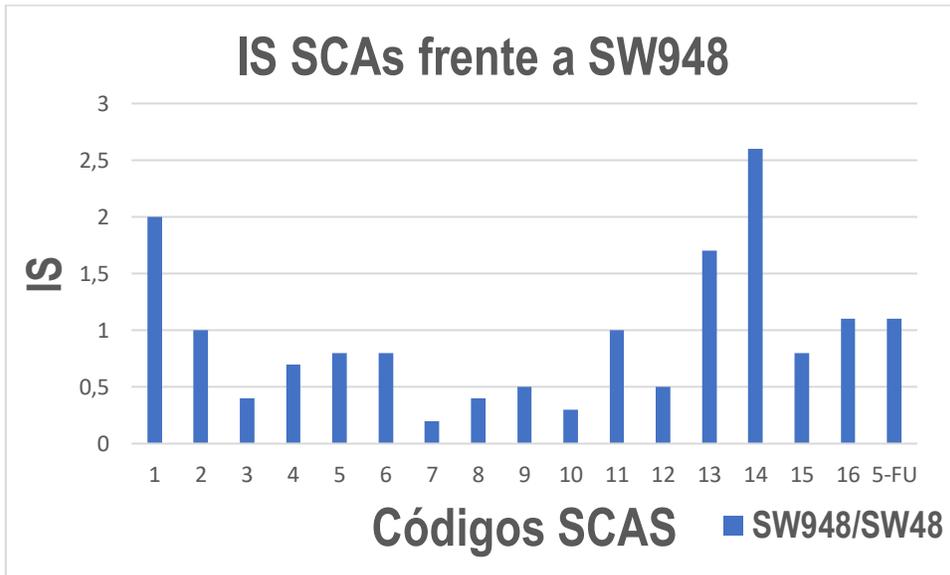
a), Índice de selectividad de la relación entre la línea celular Detroit 551 y las tres líneas celulares del ensayo SW948, 48 y 620. b). Índice de selectividad de la relación entre el tejido colorrectal de ratones Balb-C (TCRM) y las tres líneas celulares del ensayo SW948, 48 y 620. c). Índice de selectividad de la relación entre las células PBMCs y las tres líneas celulares del ensayo SW948, 48 y 620.

Tabla 7. Selectividad de las SCAF para células pre-metastásicas SW948 vs. metastásicas SW48 y SW620.

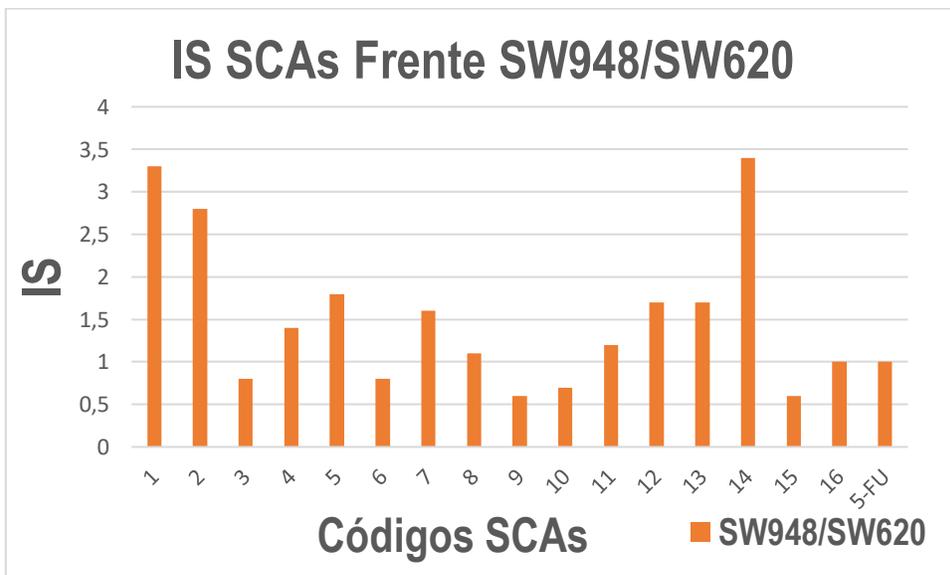
| Codigo | SW948/SW48 | SW948/SW620 | SW48/SW620 |
|---------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 2,0 | 3,3 | 1,7 |
| 2 | 1,0 | 2,8 | 2,7 |
| 3 | 0,4 | 0,8 | 1,9 |
| 4 | 0,7 | 1,4 | 1,9 |
| 5 | 0,8 | 1,8 | 2,1 |
| 6 | 0,8 | 0,8 | 1,4 |
| 7 | 0,2 | 1,6 | 2,6 |
| 8 | 0,4 | 1,1 | 2,6 |
| 9 | 0,5 | 0,6 | 1,2 |
| 10 | 0,3 | 0,7 | 2,3 |
| 11 | 1,0 | 1,2 | 1,2 |
| 12 | 0,5 | 1,7 | 3,2 |
| 13 | 1,7 | 1,7 | 1,0 |
| 14 | 2,6 | 3,4 | 1,3 |
| 15 | 0,8 | 0,6 | 0,8 |
| 16 | 1,1 | 1,0 | 0,9 |
| 5-FU | 1,1 | 1,0 | 0,9 |

Los datos corresponden a la tasa entre la CC₅₀ para células con fenotipo pre-metastásico SW948 y la CC₅₀ para células de CCR metastásico in situ SW48 y metastásico invasivo SW620. SW620: adenocarcinoma colorrectal metastásico invasivo Tipo C de Duke; SW48: adenocarcinoma colorrectal metastásico no invasivo tipo C, grado IV de Duke; SW948: adenocarcinoma colorrectal pre-metastásico tipo C de Duke, grado III.

a).



b).



c).

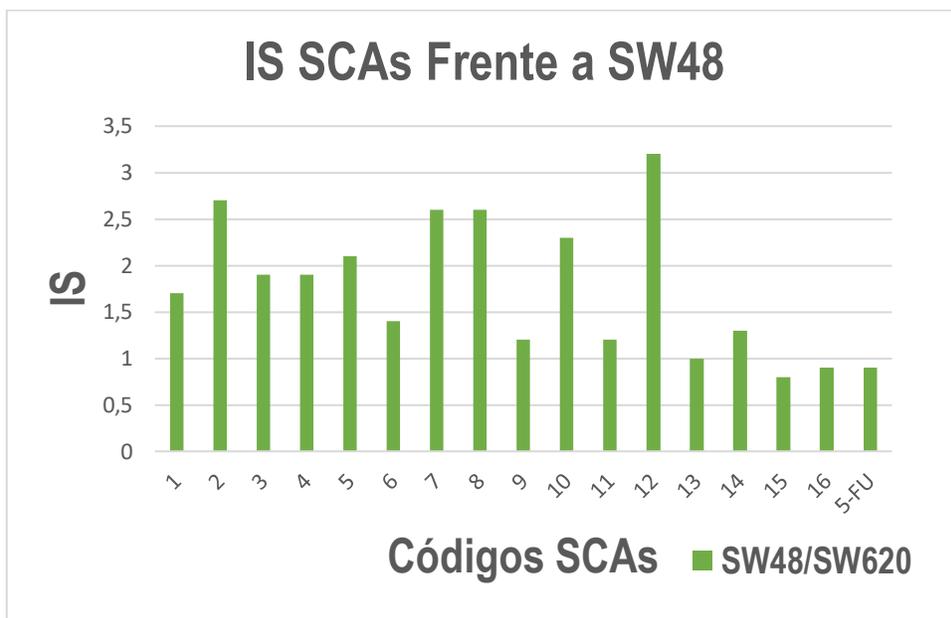


Figura 17. Gráficas del índice de selectividad para células pre-metastásicas SW948 vs. metastásicas SW48 y SW620. a), Índice de selectividad de la relación entre la línea celular SW948 premetástasica y la línea celular del ensayo SW48 metastásica *in situ*. b). Índice de selectividad de la relación entre línea celular SW948 premetástasica y la línea celular del ensayo SW620 metastásica invasiva. c). Índice de selectividad de la relación entre línea celular SW48 premetástasica y la línea celular del ensayo SW620 metastásica invasiva.

7.4 Efectos inducidos por las SCAFs 5 (C_5ClmCF_3), 11 (C_6lmCF_3) y 13 (C_6lpCF_3) sobre el ciclo celular y fragmentación del ADN, $\Delta\Psi_m$ e integridad de la membrana plasmática.

Los efectos de las SCAF 5, 11 y 13, sobre el ciclo celular y la fragmentación del ADN como mecanismos de muerte celular en líneas celulares de CCR y fibroblastos de piel Detroit 551 se evaluaron mediante la técnica de citometría de flujo usando tinción con yoduro de propidio (PI). Las SCAF 11 y 13 se seleccionaron debido al fuerte ECP (+++) y la citotoxicidad superior a la observada con 5-FU en las tres líneas celulares de CRC; a su vez, el SCAF 5 se incluyó en este análisis debido a su fuerte ECP en las tres células CRC, pero también porque tiene una mayor citotoxicidad en la línea celular SW620 CCR con un fenotipo metastásico invasivo. Aunque los SCAF 12 y 14 también

mostraron un fuerte ECP, no fueron seleccionados porque sus concentraciones citotóxicas eran más altas que las mostradas por 5-FU en las líneas celulares SW48 y SW948, respectivamente. La fragmentación del ADN entendida como muerte celular fue determinante de acuerdo con la cantidad de población de células Sub-G1.

En las células no tratadas se encontró una mayor proporción de la población G1 en relación con la población sub-G1 y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,001$) (Figura 18). La SCAF **5** (C_5ClmCF_3) a $13 \mu M$ indujo un aumento estadísticamente significativo en la población sub-G1 con una disminución de la población G1 en todas las células CCR, pero no en las células Detroit ($p < 0,05$) (Figura 18). Por el contrario, a $26 \mu M$, la población G1 aumentó y la población sub-G1 disminuyó (Figura 18).

El SCAF **11** a $11 \mu M$ aumentó la población sub-G1 solo en las células SW48 entre tanto que en las otras células la población G1 fue mayor (Figura 10), mientras que a $22 \mu M$ la población G1 fue mayor que la población sub-G1 en todas las células. Este aumento en la población G1 en relación con la población sub-G1 fue más drástico para las células con el fenotipo invasivo SW620 (Figura 18).

La SCAF **13** a $7,5 \mu M$ y $15 \mu M$ aumentó la población sub-G1 en relación con la población G1 en CCR SW48 y SW948, mientras que en las células SW620 y Detroit la población G1 fue mayor que la población sub-G1 (Figura 18).

Cuando se compararon los cambios en las poblaciones G1 y sub-G1 en las células tratadas con las células no tratadas en cada línea celular, se encontró que en el caso de la línea celular de fibroblastos Detroit 551, cuando se trató con SCAF **5** a $26 \mu M$, hubo una disminución significativa en la población G1 en relación con las células no tratadas ($p < 0,001$), sin embargo, esta disminución no ocurrió cuando se evaluó a $13 \mu M$, ni con SCAF **11** ni SCAF **13** (Figura 18). Para la línea celular metastásica *in situ* SW48, la exposición a las SCAF **5**, **11** y **13** en todas las concentraciones evaluadas aumentó el porcentaje de eventos en la población Sub G1; sin embargo, la SCAF **5** a $26 \mu M$ y la SCAF **11** a $22 \mu M$ mantuvieron el mismo nivel que los no tratados para esta población. Todos los demás compuestos generaron una disminución en la población G1. Esta disminución fue estadísticamente significativa para la SCAF **5** a $13 \mu M$, la SCAF **11** a $11 \mu M$ y SCAF **13** a $7,5 \mu M$ y $15 \mu M$ ($p < 0,001$) (Figura 18).

Con respecto a la línea celular metastásica distal SW620, se observó una disminución significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,01$ en comparación con las células no tratadas) para todas las poblaciones sub-G1 con respecto al control, cuando se trató con las SCAF, excepto la SCAF 11 a 11 μM que aumentó la población sub-G1 (Figura 18). Por otro lado, la población G1 aumenta significativamente con respecto a las células no tratadas con la SCAF 5 a 26 μM , la SCAF 11 a 22 μM y la SCAF 13 a 7,5 y 15 μM respectivamente. Por último, la exposición de la línea celular pre-metastásica SW948 con la SCAF 5 (13 μM y 26 μM) y la SCAF 13 (7,5 μM y 15 μM) aumentó significativamente la población sub-G1 con respecto a las células no tratadas ($p < 0,001$). Nuevamente la SCAF 5 (13 μM y 26 μM) y la SCAF 13 (7,5 μM y 15 μM) disminuyeron la población G1 ($p < 0,001$).

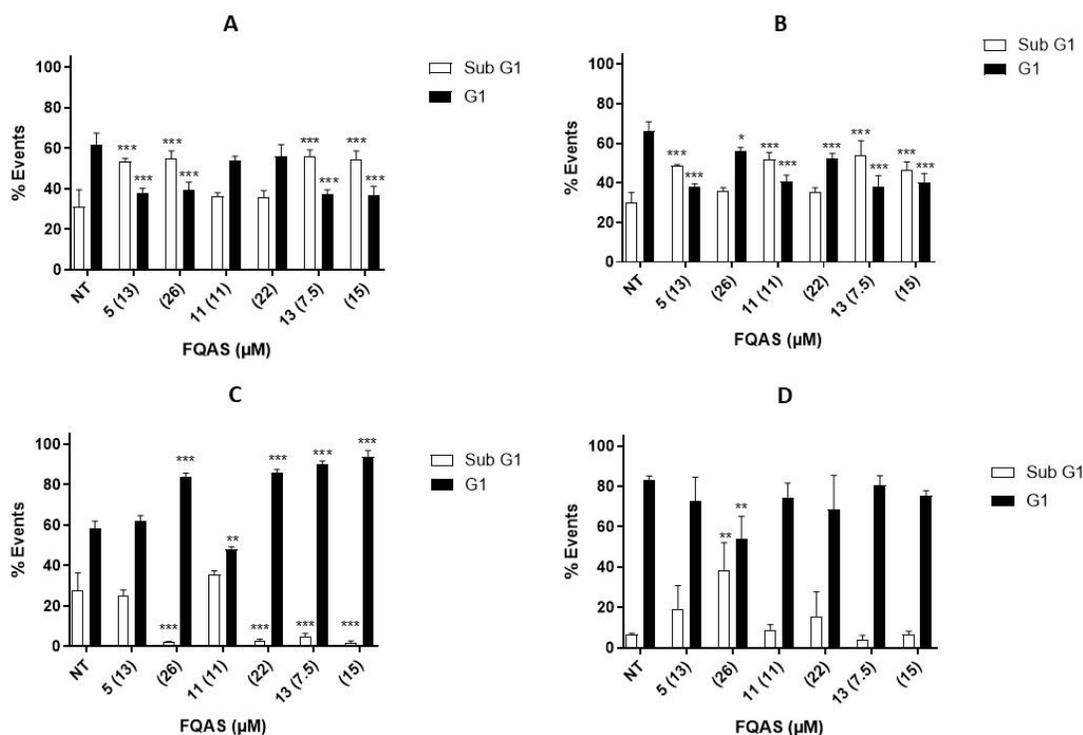


Figura 18. Detención del ciclo celular y fragmentación del ADN de diferentes líneas celulares de cáncer colorrectal después de tratamiento con las SCAF 5, 11 y 13. Marcaje con PI para las líneas celulares Detroit 551, SW48, SW620 y SW948 después del tratamiento durante 8 h con SCAF 5 (a 13 μM y 26 μM), SCAF 11 (a 11 μM y 22 μM) y SCAF 13 (a 7,5 μM y 15 μM). Prueba estadística ANOVA de comparación bidireccional de múltiples tratamientos, estadística de prueba de Dunnet $p < 0,0001$ datos analizados en Graph Pad Prisma 7.0. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) se

consideró estadísticamente significativo (ANOVA) para comparar tratamientos después de confirmar la distribución normal de los datos. Células sub G1: población de células hipodiploides; Células G1: población de células diploides. (a) Línea celular fibroblastos de piel normales Detroit 551; (b) Línea celular de CCR SW48; (c) Línea celular de CCR SW620; (d) Línea celular de CCR SW948...

La relación sub-G1/G1 cambió según el tipo de célula (Tabla 8). Mientras que la proporción de población sub-G1/G1 en las células no tratadas fue de 0,1 para las células Detroit 551, 0,4 para las células CCR SW48 y SW948 o 0,5 para las células CRC SW620 (Tabla 8), esta proporción aumentó en CCR SW48, SW948 y las células Detroit 551 después del tratamiento con las SCAF pero disminuyeron en las células SW620.

Tabla 8. Relación sub-G1/G1 para líneas celulares de cáncer colorectal (SW948, SW48 y SW620) y fibroblastos (Detroit 551).

| SCAF (μM) | Sub-G1/G1 | | | |
|------------------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| | Detroit 551 | SW48 | SW620 | SW948 |
| No tratadas | 0.1 \pm 0.0 | 0.4 \pm 0.2 | 0.5 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.2 |
| 5 (13) | 0.3 \pm 0.3 | 1.3 \pm 0.2 | 0.4 \pm 0.1 | 1.4 \pm 0.1 |
| 5 (26) | 0.9 \pm 0.6 | 0.6 \pm 0.1 | 0,02 \pm 0.0 | 1.6 \pm 0.4 |
| 11 (11) | 0.1 \pm 0.1 | 1.2 \pm 0.3 | 0,74 \pm 0.1 | 0.7 \pm 0.0 |
| 11 (22) | 0.3 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.1 | 0.0 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.1 |
| 13 (7.5) | 0.1 \pm 0.0 | 1.3 \pm 0.5 | 0.1 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.3 |
| 13 (15) | 0.1 \pm 0.0 | 1.1 \pm 0.3 | 0.0 \pm 0.0 | 0.7 \pm 0.3 |

Tras la exposición de las diferentes líneas celulares a SCAF, no se observaron alteraciones en la población G2/M (células tetraploides) y población S (población celular en fase de síntesis) (datos no mostrados).

Los efectos que las SCAF 5, 11 y 13 generaron en el potencial mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) y el daño en membrana celular en líneas celulares de CCR SW48, SW620 y SW948 y la línea de fibroblastos de piel normal Detroit 551 se evaluaron mediante la técnica de citometría de flujo usando la tinción DiOC-

6 (marcador de procesos de muerte de tipo apoptótica) y PI (marcador de eventos tardíos de muerte celular).

En las células SW48 con fenotipo metastásico *in situ*, se observó que todos los compuestos afectaron la viabilidad de las células con disminución del número de eventos en el Q3. Los compuestos **5**, **11** y **13** a la menor concentración evaluada disminuyeron la viabilidad celular en un 6% aproximadamente, mientras que con las mayores concentraciones evaluadas la viabilidad celular disminuyó entre un 15% y un 18%, siendo el SCAF **11** a la concentración de 22 μM el de mayor efecto (Figura 19a). Todos los compuestos a las concentraciones evaluadas indujeron un aumento en la población de células con una membrana plasmática hiperpolarizada ($\Delta\Psi_m +$) en un 60% y 100%, siendo también el SCAF **11** a la concentración de 22 μM el de mayor efecto; sin embargo, estos efectos no fueron estadísticamente significativos.

En las células SW620 con fenotipo metastásico *invasivo*, se observó que el compuesto **11** a la concentración de 22 μM y el compuesto **13** a una concentración de 15 μM afectó de manera estadísticamente significativa ($p < 0,01$) la viabilidad celular por afectación del potencial de membrana, con una disminución del 52,4% y 20,2%, respectivamente (Figura 19b), mientras que el compuesto **5** a la concentración de 26 μM , el compuesto **11** a la concentración de 11 μM y el compuesto **13** a la concentración de 7,5 μM afectaron de manera leve la viabilidad celular con una disminución de 9.4%, 8,4% y 2,6%, respectivamente, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) Por su parte los compuestos **5** a la concentración de 13 μM y el compuesto **13** a la concentración de 7,5 μM no afectaron el potencial de membrana plasmática con un aumento en el porcentaje de células en el Q3 y, por lo tanto, la viabilidad celular aumentó en un 7,9% y 4.1%, respectivamente. Todos los compuestos con excepción del compuesto **5** a la concentración de 13 μM indujeron un aumento en la población de células con una membrana plasmática hiperpolarizada ($\Delta\Psi_m+$) en un 76% y 100%, la SCAF **11** a la concentración de 22 μM y SCAF **13** a 15 μM tuvieron el efecto más significativo.

En las células SW948 con fenotipo pre-metastásico, se observó que todos los compuestos evaluados afectaron la viabilidad celular por afectación del potencial de membrana, con una disminución del 45,3% y 65,7% en la viabilidad celular con el compuesto **11** a la concentración de 11 μM y 22 μM , respectivamente y de 11,7%, 34,6%, 39,8% y 38,3% con los compuestos **5** a la concentración de 26

μM , y el compuesto **13** a las concentraciones de $7.5 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 19c). Todos los compuestos a las concentraciones evaluadas indujeron un aumento en la población de células con una membrana plasmática hiperpolarizada ($\Delta\Psi_{m+}$) entre 0.7 veces y 5.9 veces con respecto a las células no tratadas, siendo de nuevo el compuesto **11** a la concentración de $22 \mu\text{M}$ el de mayor efecto, aunque sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

En las células Detroit 551 (fibroblastos humanos de fenotipo normal) se observó que la SCAF **5** a la concentración de $26 \mu\text{M}$ afectó de manera importante la viabilidad celular por afectación del potencial de membrana, con una disminución del 95.8%. siendo este resultado estadísticamente significativo ($p<0,01$). Los demás compuestos afectaron la viabilidad celular por afectación del potencial de membrana con una disminución el porcentaje de viabilidad de 5.7% para el compuesto **5** a $13 \mu\text{M}$, de 3.2% y 17.4% para el compuesto **11** a las concentraciones de $11 \mu\text{M}$ y $22 \mu\text{M}$ y de 0,7% y 23,9 con el compuesto **13** a la concentración de $7,5 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$, respectivamente (Figura 19d). Todos los compuestos a las concentraciones evaluadas indujeron un aumento en la población de células con una membrana plasmática hiperpolarizada ($\Delta\Psi_{m+}$) entre 1.3 veces y 27,5 veces con respecto a las células no tratadas; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). De nuevo el compuesto **5** a la concentración de $26 \mu\text{M}$ fue el de mayor efecto.

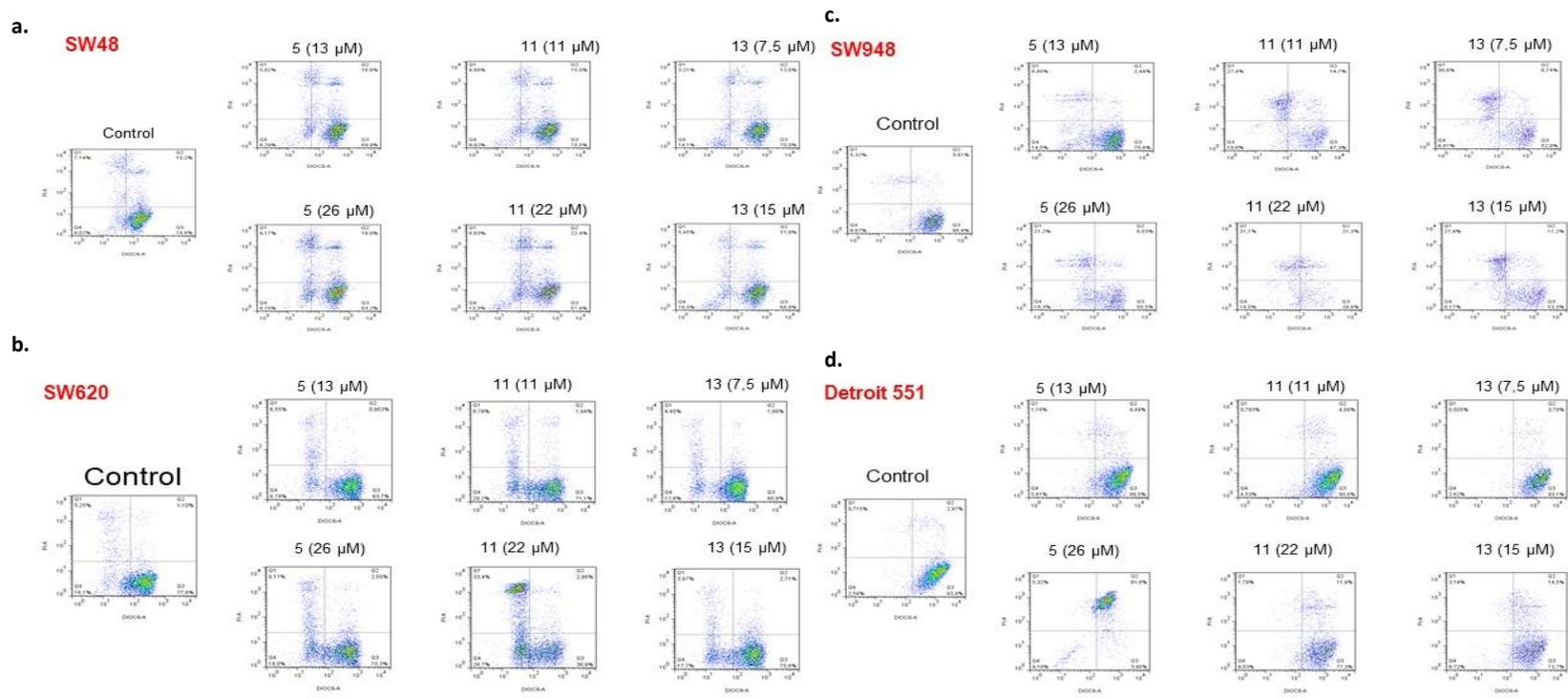


Figura 19. Integridad de la membrana plasmática en líneas celulares de cáncer colorrectal SW48, SW620 y SW948 frente a fibroblastos Detroit 551 normales tratados con SCAF 5, 11 y 13. Los gráficos de puntos representativos corresponden a los porcentajes de Detroit 551 (A), SW48 (B), SW620 (C) y SW948 (D) células positivas para DIOC6/PI después de 8 h de exposición a las SCAF 5, 11 y 13 en concentraciones correspondientes a CC_{50} y $CC_{50/2}$ para cada línea celular: La SCAF 5 (a 13 μ M y 26 μ M), la SCAF 11 (a 11 μ M y 22 μ M) y la SCAF 13 (a 7,5 μ M y 15 μ M). Prueba estadística ANOVA bidireccional con prueba de Tukey para comparaciones múltiples, datos estadísticos de prueba de Kruskal-Wallis

analizados en Graph Pad Prisma 7.0. Un $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) se consideraron estadísticamente significativos para comparar tratamientos después de confirmar la distribución normal de los datos. Q1: células muertas; Q2: $\Delta\Psi_m$ (+); Q3: células vivas; Q4: $\Delta\Psi_m$ (-).

Con el objetivo de identificar si las SCAFs **5**, **11** y **13** inducen la traslocación de la PS desde la cara citosólica de la membrana celular a la cara externa se realizaron los ensayos con la tinción de Anexina-V/PI en las líneas celulares de cáncer colorrectal SW48, SW948 Y SW620 y la línea celular de fibroblastos Detroit 551. Se observó que en las células SW48, que corresponden a células derivadas de adenocarcinoma colorrectal metastásico no invasivo, expuestas a los compuestos **5** a 26 μM , **11** a 11 μM y 22 μM y **13** a 15 μM disminuyó de manera estadísticamente significativa ($p < 0,01$) la población de células vivas (Q4); mientras que en las células SW48 expuestas a los compuestos **5** a 13 μM y **13** a 7,5 μM se mantuvo la población en porcentajes similares a las células control (sin tratamiento). No se observaron cambios en los cuadrantes Q1, Q2 y Q3 que corresponden a las poblaciones de células con daño en membrana, apoptosis temprana y apoptosis tardía, respectivamente (Figura 20); por su parte, para la línea celular SW620 (células con fenotipo metastásico invasivo) expuesta a los diferentes compuestos y concentraciones se evidenció una disminución aunque leve y no estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en la población de células vivas (Q4), así como también en las poblaciones de células con daño en la membrana plasmática (poblaciones que se ubican en los demás cuadrantes tampoco varían de manera significativa con respecto al control ($p > 0,05$)). No se observaron cambios en los cuadrantes (Q1), o en estado de apoptosis tardía (Q2) o apoptosis temprana (Q3) (Figura 20).

Al contrario, en la línea celular SW948 que corresponde a un fenotipo pre-metastásico, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la población de células vivas (Q4) cuando estuvieron expuestas al SCAF **11** a la concentración de 22 μM , mientras que con los demás compuestos y concentraciones, se observó una disminución leve en la población de células vivas pero sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) con respecto al control de células no tratadas (Figura 20). Para los fibroblastos de piel solo se observó disminución de la población de células vivas (Q4) cuando estuvieron expuestas al SCAF **5** a una concentración de 13 μM y 26 μM (Figura 20); a la concentración de 26 μM se observó además un aumento de los eventos ubicados en el Q1 que corresponden a células con alteraciones en la membrana celular pero donde no hay exposición de la PS. Para las SCAFs **11** μM a 11 y 22 μM y **13** a 7,5 μM y 15 μM se observó un aumento leve en la población de células con membrana plasmática alterada (Q1) y una disminución leve en la población de células vivas (Q4), sugiriendo que la inducción del compuesto **11** en esta línea celular control podría inducir en las células daño en la membrana celular.

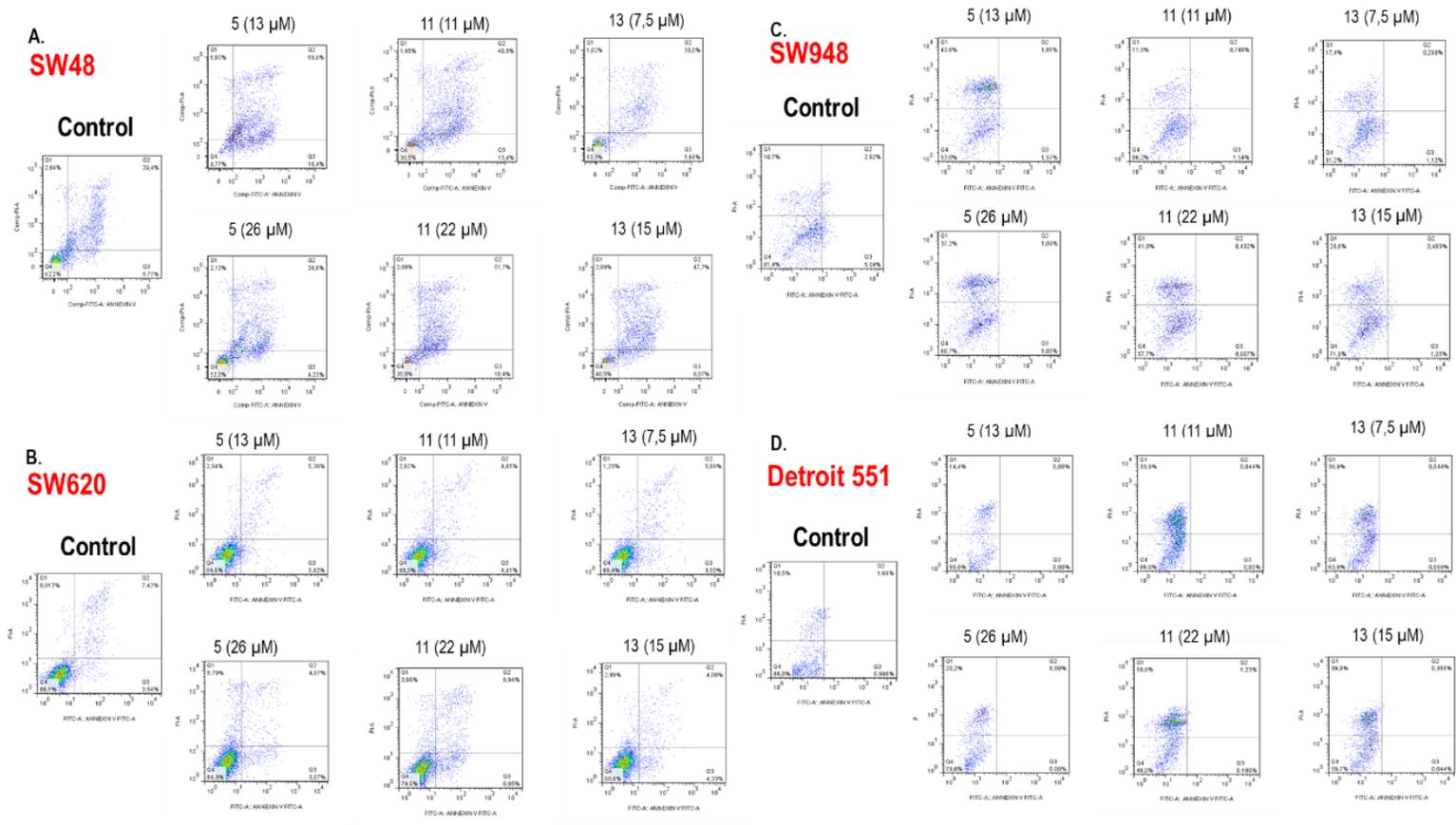


Figura 20. Exposición de PS en la membrana plasmática de líneas celulares de cáncer colorrectal SW48, SW620 y SW948 vs fibroblastos Detroit 551 tratadas con las SCAFs 5, 11 y 13. Los dot plots representativos corresponden a los porcentajes de células SW48, SW948, SW620 y Detroit 551 positivas para Anexina -V/PI después de 8 h de exposición a los compuestos SCAF 5, 11 y 13 a las concentraciones correspondientes a las CC₅₀ y CC_{50/2} para cada línea celular: 5 (a 13 μ M y 26 μ M), 11 (a 11 μ M y 22 μ M) y 13 (a 7.5 μ M y 15 μ M). Prueba estadística ANOVA de dos vías con la prueba de Tukey de comparaciones múltiples, estadístico de prueba Kruskal-Wallis datos analizados en Graph Pad Prisma 7.0. Se consideró estadísticamente significativo un valor de

$p > 0,05$ (NS); $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) para comparar los tratamientos después de confirmar la distribución normal de los datos. Q1: Anexina-V(-)/PI(+) daño en membrana Q2: DEAD "apoptosis tardía", Q3: Anexina-V (+)/PI(-) "apoptosis temprana" Q4: ALIVE.

7.5 Análisis *in silico* de propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de las SCAFs y SCA no F

Los parámetros analizados para los compuestos promisorios se resumen en la Tabla 9. Después de obtener las fórmulas SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) de cada compuesto, se ingresaron a las dos diferentes plataformas obteniéndose datos fisicoquímicos como la masa molar que se oscila entre 577,77 a 683 g/mol en la plataforma SwissADME dado que esta tiene en cuenta al anión yodo (I) para la generación de este cálculo, mientras que en la plataforma ADMETLab2.0 las masas molares oscilan entre 450,14 a 556,09, demás parámetros como número de hidrógenos aceptores (NHA) varían entre ambas plataformas de 1 para ADMETLab2.0 y 6 para SwissADME, mientras que valores como el número de hidrógenos donadores se mantienen en ambas herramientas con un valor de cero (0), al igual que el número de rotaciones (#RT) de enlaces de 9 para el compuesto 5 y 10 para los compuestos 11 y 13.

Parámetros como el área de superficie polar topológica (TPSA) se mantienen igual en ambas herramientas 0,000 Å² y parámetros que tienen que ver con la solubilidad tales como LogS logaritmo de la solubilidad acuosa que varía entre las dos herramientas en un valor de 4 a 5 veces sin embargo el resultado neto se asume en ambas plataformas como moléculas poco solubles en solventes de tipo polar. Por otro lado, el LogP coeficiente de partición (logOctanol/agua) que presenta una diferencia pequeña entre ambas herramientas 0,5 en promedio y que con los valores registrados son moléculas altamente apolares con mayor solubilidad en solventes orgánicos. Por último, los valores de LogD, LogP a pH fisiológico 7.4 no se obtuvieron por SwissADME ya que no los reporta, solo se obtuvieron en la plataforma ADMETLab2.0 confirmando la gran apolaridad de estas moléculas. Con relación a los parámetros en química medicinal como el cumplimiento de las 5 reglas de Lipinsky en la plataforma ADMETLab2.0 el compuesto 5 se acepta, mientras que en Swiss ADME generó una alerta debido a que la masa molar excede los 500 g/mol; en el caso de los compuestos 11 y 13 son rechazados debido al exceso de masa molar. Con relación a las reglas de Veber son rechazados por ADMETLab2.0 y aceptados por SwissADME debido a que los parámetros que revisa ADMETLab2.0 están relacionados a la masa molar ≤ 400 y $\text{LogP} \leq 4$ para lo cual la mayoría de SCAFs analizadas no cumple, mientras que los parámetros que se evalúan en SwissADME de las reglas de Veber son el número de enlaces

giratorios (Rotable bonds) ≤ 10 y el área de superficie polar topológica TPSA ≤ 10 parámetros que las SCAFs cumple en su mayoría. Los compuestos no generaron ninguna alerta en las plataformas analizadas cuando se evaluó el parámetro de PAINS (Pan Assay Interference Compounds, frequent hitters, Alpha-screen artifacts and reactive compounds) que evalúa una manera de interactuar químicamente de manera inespecífica con varios blancos biológicos en lograr afectar al blanco que se desea. Adicionalmente, ninguno de los compuestos analizados atraviesa la barrera hematoencefálica (Tabla 9).

Parámetros Lipinsky: MW ≤ 500 ; LogP ≤ 5 ; nHA ≤ 10 ; nHD ≤ 5 , si dos propiedades están fuera del rango es posible una poca absorción o permeabilidad, una es aceptable. Parámetros Veber o reglas Glaxo Smith Kline (GSK) MW ≤ 400 ; logP ≤ 4 , nRot ≤ 10 , TPSA ≤ 140 , los compuestos que satisfacen las reglas GSK pueden tener un perfil ADMET más favorable. ADMETLab2,0 no tiene en cuenta el átomo de I para evaluar la masa molar debido a que el algoritmo programado no tiene en cuenta átomos que no están unidos covalentemente a las moléculas.

Tabla 9. Análisis *in silico* de parámetros fisicoquímicos y farmacológicos de las SCAF y SCA no F

| Compuesto/ Parámetros | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
|-----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A. ADMETLab2.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Propiedades fisicoquímicas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MW* | 330 | 442,08 | 364,16 | 456,1 | 450,14 | 542,08 | 430,2 | 450,14 | 542,08 | 430,2 | 556,09 | 464,16 | 556,09 | 444,21 | 406,1 | 420,12 |
| nHA | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| nHD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| nRot | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 8 |
| TPSA (Å²) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| logS | 0.033 | -0,596 | -1,47 | -1,048 | -3,711 | -3,413 | -2,618 | -4,142 | -3,965 | -3,632 | -3,827 | -4,373 | -4,221 | -4,054 | -0,027 | -0,248 |
| logP | 3.894 | 3,847 | 4,204 | 4,221 | 4,87 | 4,899 | 4,931 | 5,024 | 5,049 | 5,073 | 5,277 | 5,415 | 5,424 | 5,445 | 3,647 | 3,982 |
| logD | 3.003 | 3,217 | 3,47 | 3,295 | 4,307 | 4,177 | 4,141 | 4,385 | 4,242 | 4,141 | 4,156 | 4,344 | 4,22 | 4,16 | 2,935 | 2,992 |
| Propiedades farmacológicas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lipinsky | A | A | A | A | A | A | A | A | R | R | R | A | R | A | A | A |
| Veber | A | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| PAINS | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| Distribución | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------|--------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| BBB- Penetration | Si | Si | Si | Si | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | Si | Si |
| B. SwissADME | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Propiedades fisicoquímicas | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MW ^a | 457,34 | 569.21 | 491.78 | 583.2 4 | 577.77 | 669.2 | 557.35 | 577.7 | 669.2 | 557.3 | 683,2 | 591.8 | 683.2 | 571,3 | 533.2 | 547.2 |
| nHA | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 |
| nHD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| nRot | 7 | 7 | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 7 | 8 |
| TPSA (Å ²) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| logS | -8 | -7,63 | -7,26 | -7,86 | -8,43 | -9,04 | -8,1 | -8,43 | -9,04 | -8,1 | -9,27 | -8,67 | -9,27 | -8,34 | -7,31 | -7,54 |
| logP | 3,900 | 4,13 | 4,25 | 4,42 | 5,38 | 5,55 | 5,21 | 5,37 | 5,55 | 5,23 | 5,86 | 5,73 | 5,85 | 5,73 | 3,59 | 3,83 |
| logD | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND |
| Química medicinal | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lipinsky (Pfizer) | A | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** | A ** |
| Veber (GSK) | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A | A |
| PAINS | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| Distribucion | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BBB- Penetration | Si | Si | Si | Si | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | Si | Si |

^aMasa molar; nHA: número de hidrógenos Aceptores (valor óptimo. 0 – 12); nHD: número de hidrógenos donadores (valor óptimo 0 – 7); nRot: número de rotaciones de enlaces (valor óptimo 0 – 11); TSPA: área de superficie polar topológica (valor óptimo: 0 – 140); LogS: logaritmo de la solubilidad acuosa (valor óptimo: -4 a 0,5);

Log mol/L: 0 (para ADMETLab2) y <-10 <-6 poco soluble (SwissADME); LogP: coeficiente de partición; LogD: coeficiente de distribución; PAINS: Pan-Assay INterference Substances; BBB: barrera sangre-cerebro; PPB: union de proteínas a membrana; A: Aceptado; R: Rechazado; P: Probable..ND: no data. ** 1 violation (MW>500). SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) y ADMETLab2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com>).

7.6 Referenciación de metabolitos anotados mediante análisis multiplataforma

Una vez fueron preprocesados los datos crudos y se consolidó la integración de estos se exportó a Excel la información consolidada de las señales encontradas de manera organizada y para las anotaciones de características moleculares estadísticamente significativas se realizaron análisis estadísticos multivariantes (MVA) utilizando SIMCA-P 16.0 (Umetrics), que permitieron generar el listado de anotaciones de metabolitos según las comparaciones entre los tres grupos de células, a saber: G6: células SW620 no tratadas; G7: células SW620 tratadas con SCAF **11**; y G8: células SW620 tratadas con SCAF **13** (Tabla 10).

Tabla 10. Referenciación de metabolitos encontrados en el análisis de comparaciones entre las SCAFs y células SW620.

| Compuesto | Formula | Mass | RT (min) | Mass Error (ppm) | Adduct | ^a CV for QC (%) | Analytical platform | G7 vs G8 | | | G8 vs G6 | | | G7 vs G8 | | |
|---|---|----------|----------|------------------|--------------------------------|----------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|----------------|--------------------------|-------------------|----------------|--------------------------|-------------------|----------------|
| | | | | | | | | ^b Fold Change | ^c VI P | <i>p</i> value | ^b Fold Change | ^c VI P | <i>p</i> value | ^b Fold Change | ^c VI P | <i>p</i> value |
| Azoles | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Allantoin | C ₄ H ₆ N ₄ O ₃ | 158,044 | 3,44 | 4 | [M-H]- | 3,73 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,62 | 1,20 | - | 0,85 | - | - | 1,37 | 1,10 | 4,51E-02 |
| Carboxylic acids and derivatives | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Creatinine | C ₄ H ₇ N ₃ O | 113,0589 | 8,29 | 7 | [M-H]- | 4,64 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,55 | 1,24 | - | 0,84 | - | - | 1,52 | 1,12 | 4,51E-02 |
| Acetylglutamine | C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₄ | 188,0797 | 13,46 | 3 | [M-H]- | 12,17 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,29 | 1,54 | - | 0,88 | - | - | 2,98 | 1,44 | 1,55E-03 |
| Capryloylglycine | C ₁₀ H ₁₉ NO ₃ | 201,1365 | 3,77 | 5 | [M+Cl]- | 4,43 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,35 | 1,00 | 4,80E-02 | 0,42 | 1,08 | 4,01E-02 | 1,19 | - | - |
| Heptanoylglycine | C ₉ H ₁₇ NO ₃ | 187,1208 | 8,52 | 6 | [M-H]- | 6,16 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,41 | 1,16 | 3,03E-02 | 0,42 | 1,38 | 2,05E-02 | 1,01 | - | - |
| Undecanoylglycine | C ₁₃ H ₂₅ NO ₃ | 243,1834 | 5,37 | 3 | [M-H]- | 8,75 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,59 | 1,13 | 3,03E-02 | 0,62 | 1,52 | 4,01E-02 | 1,05 | - | - |
| Asn-Ala-OH | C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₇ | 311,0754 | 12,49 | 8 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 11,07 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,45 | 1,49 | - | 1,30 | 1,09 | - | 2,87 | 1,39 | 2,46E-02* |
| Acetyl-methionine | C ₇ H ₁₃ NO ₃ S | 191,0616 | 12,3 | 5 | [M-H]- | 14,66 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,50 | 1,00 | - | 0,82 | - | - | 1,62 | 1,05 | 1,09E-02 |
| Met-Leu-OH | C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₆ S | 370,1199 | 12,65 | 0 | [[M-H]-H ₂ O]- | 18,85 | HILIC-LC- | 0,56 | - | - | 1,03 | - | - | 1,82 | 1,05 | 4,51E-02 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|----------|-------|----|--------------------------------|-------|---------------|------|------|---|------|------|--|------|------|----------|--|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | | |
| Leucine | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 131,0946 | 2,02 | 2 | [M-H]- | 4,85 | RP-LC-QTOF-MS | 0,54 | 4,29 | - | 0,66 | 3,91 | | 0,81 | 2,94 | | |
| Lactoyl-Phenylalanine | C ₁₂ H ₁₅ NO ₄ | 237,1001 | 3,19 | 1 | [M-H]- | 9,10 | RP-LC-QTOF-MS | 0,31 | 1,08 | - | 0,40 | 1,06 | | 0,78 | - | | |
| Lactoyl-Tyrosine | C ₁₂ H ₁₅ NO ₅ | 253,095 | 1,76 | 1 | [M-H]- | 7,68 | RP-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,09 | - | 0,37 | - | | 0,79 | - | | |
| Acetyl-phenylalanine | C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ | 207,0895 | 1,76 | 1 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 7,68 | RP-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,09 | - | 0,37 | - | | 0,79 | - | | |
| Deoxyfructosyl phenylalanine | C ₁₅ H ₂₁ NO ₇ | 327,1318 | 3,19 | 1 | [M-H]- | 8,52 | RP-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,10 | - | 0,37 | 1,09 | | 0,80 | - | | |
| Deoxyfructosyl tyrosine | C ₁₅ H ₂₁ NO ₈ | 343,1267 | 1,77 | 2 | [M-H]- | 10,43 | RP-LC-QTOF-MS | 0,28 | 1,47 | - | 0,34 | - | | 0,84 | - | | |
| Undecanoylglycine | C ₁₃ H ₂₅ NO ₃ | 243,1834 | 18,75 | 1 | [M-H]- | 4,69 | RP-LC-QTOF-MS | 0,61 | 1,21 | - | 0,72 | - | | 0,85 | - | | |
| Leu-Tyr-OH | C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₇ | 402,1427 | 1,75 | 6 | [[M-H]-H ₂ O]- | 10,89 | RP-LC-QTOF-MS | 0,91 | - | - | 1,08 | - | | 0,84 | 1,41 | | |
| Hydroxy-isoleucine | C ₆ H ₁₃ NO ₃ | 147,0895 | 3,86 | 2 | [M-H]- | 4,03 | RP-LC-QTOF-MS | 0,56 | 1,66 | - | 1,33 | 1,52 | | 0,42 | 3,05 | 4,90E-02 | |
| Phenylalanine | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 165,079 | 3,2 | 1 | [M-H]- | 4,44 | RP-LC-QTOF-MS | 0,68 | 3,27 | - | 0,81 | 2,84 | | 0,83 | 2,75 | | |
| Glutamate | C ₅ H ₉ NO ₄ | 147,0532 | 1,64 | 2 | [M-H]- | 6,25 | RP-LC-QTOF-MS | 0,94 | 1,18 | - | 1,06 | 1,14 | | 0,88 | 1,69 | | |
| Acetylserine | C ₅ H ₉ NO ₄ | 147,0532 | 1,64 | 2 | [M-H]- | 6,25 | RP-LC-QTOF-MS | 0,94 | 1,18 | - | 1,06 | 1,14 | | 0,88 | 1,69 | | |
| Tryptophan | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 204,0899 | 6,97 | 1 | [M-H]- | 4,77 | RP-LC-QTOF-MS | 0,91 | 1,25 | - | 1,08 | 1,28 | | 0,84 | 1,59 | | |
| Succinyl-diaminopimelate | C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₇ | 290,1114 | 15,56 | 10 | [M-H]- | 4,63 | RP-LC-QTOF-MS | 0,87 | 1,31 | - | 1,07 | 1,31 | | 0,82 | 1,63 | | |
| Aminocyclopropane-carboxylate | C ₄ H ₇ NO ₂ | 101,0477 | 1,23 | 2 | [[M-H]-H ₂ O]- | 3,61 | RP-LC-QTOF-MS | 0,87 | 1,48 | - | 0,96 | 1,15 | | 0,91 | - | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------|-----------|---|--|-------|------------------------------|------|----------|----------|------|----------|----------|------|----------|-----------|
| Oleoyl glycine | C ₂₀ H ₃₇ NO ₃ | 339,277 3 | 20,9 5 | 7 | [M+Cl]- | 1,86 | RP-LC- QTOF- MS | 0,04 | 4,6 3 | - | 0,32 | - | | 0,13 | - | |
| Pyroglutamic acid | C ₅ H ₇ NO ₃ | 129,042 6 | 1,64 | 2 | [M-H]- | 6,35 | RP-LC- QTOF- MS | 0,93 | 1,2 3 | - | 1,07 | - | | 0,87 | 1,8 1 | |
| Methionyl-Arginine | C ₁₁ H ₂₃ N ₅ O ₃ S | 305,152 2 | 3,28 | 4 | [M+Na] ⁺ | 5,85 | RP-LC- QTOF- MS | 0,37 | 2,9 0 | 3,64E-02 | 0,38 | 3,0 6 | 1,76E-02 | 1,03 | - | - |
| Hydroxyvaleryl glycine | C ₇ H ₁₃ NO ₄ | 175,084 5 | 0,98 | 4 | [M+H] ⁺ | 7,88 | RP-LC- QTOF- MS | 1,21 | - | - | 0,83 | - | - | 0,69 | 1,3 8 | 4,90E-02 |
| Diazines | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Uracil | C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ | 112,027 3 | 4,07 | 4 | [M-H]- | 11,75 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,29 | 1,4 8 | 2,53E-03 | 1,26 | - | | 4,28 | 1,0 2 | - |
| Fatty acid | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hexadienoic acid | C ₆ H ₈ O ₂ | 112,052 4 | 1,16 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 15,00 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,39 | 1,5 0 | 2,53E-03 | 0,88 | - | - | 2,29 | 1,1 8 | 1,86E-02 |
| Glycerolipids | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DG(44:6) | C ₄₇ H ₈₀ O ₅ | 724,600 6 | 11,8 | 8 | [M+Cl]- | 8,45 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,54 | 1,3 9 | 1,01E-02 | 1,43 | 1,0 6 | - | 2,64 | 1,2 6 | 3,44E-02* |
| DG(44:5) | C ₄₇ H ₈₂ O ₅ | 726,616 2 | 11,7 8 | 7 | [M+Cl]- | 9,62 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,72 | - | - | 1,65 | 1,2 9 | - | 2,28 | 1,2 9 | 3,44E-02* |
| DG(44:4) | C ₄₇ H ₈₄ O ₅ | 728,631 9 | 11,6 6 | 7 | [M+Cl]- | 8,55 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,73 | - | - | 1,54 | 1,0 6 | - | 2,10 | 1,1 5 | 1,09E-02 |
| DG(42:10) | C ₄₅ H ₈₈ O ₅ | 688,506 7 | | 1 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 14,37 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,70 | 1,0 5 | - | 1,55 | 1,0 3 | - | 2,22 | 1,0 8 | 1,86E-02 |
| Glycerophospholipids | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LPG(18:1) | C ₂₄ H ₄₇ O ₉ P | 510,295 8 | 7,04 | 1 | [M-H]- | 13,97 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,01 | - | - | 1,67 | 1,3 2 | 5,91E-03 | 1,65 | 1,0 7 | 4,51E-02 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--------------|------|---|--|-------|------------------------------|------|----------|----------|------|----------|---------------|------|----------|---------------|
| PG(32:1) | C ₃₈ H ₇₃ O ₁₀ P | 720,494 1 | 3,99 | 3 | [M-H]- | 14,39 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,64 | 1,0 3 | - | 1,70 | - | - | 2,65 | 1,0 1 | 4,51E -02 |
| PA(P-36:2) | C ₃₉ H ₇₃ O ₇ P | 684,509 4 | | 9 | [M+Cl]- | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PG(33:2) | C ₃₉ H ₇₃ O ₁₀ P | 732,494 1 | 3,98 | 2 | [M-H]- | 14,59 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,23 | 1,4 2 | 1,01E-02 | 1,84 | 1,1 5 | - | 8,19 | 1,2 3 | 1,55E -03 |
| PG(35:2) | C ₄₁ H ₇₇ O ₁₀ P | 760,525 4 | 3,76 | 1 | [M-H]- | 14,25 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,61 | 1,1 5 | - | 1,40 | - | - | 2,29 | 1,0 4 | 2,95E -02 |
| PG(36:4) | C ₄₂ H ₇₅ O ₁₀ P | 770,509 8 | 5,14 | 2 | [M-H]- | 11,57 | HILIC- LC- QTOF- MS | 2,33 | 1,5 4 | 2,53E-03 | 1,26 | - | - | 0,54 | 1,2 8 | 1,09E -02 |
| PA(35:1) | C ₃₈ H ₇₃ O ₈ P | 688,504 3 | | 3 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PG(36:5) | C ₄₂ H ₇₃ O ₁₀ P | 768,494 1 | 5,15 | 1 | [M-H]- | 11,48 | HILIC- LC- QTOF- MS | 2,67 | 1,5 9 | 2,53E-03 | 1,19 | - | - | 0,44 | 1,4 2 | 2,46E -02* |
| PA(35:2) | C ₃₈ H ₇₁ O ₈ P | 686,488 7 | | 3 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PG(36:3) | C ₄₂ H ₇₇ O ₁₀ P | 772,525 4 | 5,23 | 2 | [M-H]- | 11,27 | HILIC- LC- QTOF- MS | 2,28 | 1,4 3 | 1,01E-02 | 1,32 | - | - | 0,58 | 1,2 7 | 1,86E -02 |
| PG(38:4) | C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P | 798,541 1 | 5,06 | 3 | [M-H]- | 12,00 | HILIC- LC- QTOF- MS | 2,24 | 1,3 6 | 1,01E-02 | 1,60 | - | - | 0,71 | - | - |
| PG(38:4) | C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P | 798,541 1 | 3,6 | 2 | [M-H]- | 15,52 | | 0,65 | 1,1 3 | - | 1,40 | - | - | 2,15 | 1,0 4 | 4,51E -02 |
| PG(38:4) | C ₄₄ H ₇₉ O ₁₀ P | 798,541 1 | 7,83 | 9 | [M+Cl]- | 14,16 | HILIC- LC- QTOF- MS | 2,22 | 1,2 7 | 3,03E-02 | 3,01 | 1,6 3 | 2,72E -02* | 1,36 | - | - |
| PI(34:2) | C ₄₃ H ₇₉ O ₁₃ P | 834,525 8 | 3,76 | 1 | [M-H]- | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PG(38:2) | C ₄₄ H ₈₃ O ₁₀ P | 802,572 4 | 3,76 | 5 | [M-H]- | 14,28 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,59 | 1,0 4 | - | 1,57 | - | - | 2,64 | 1,0 2 | 1,86E -02 |
| PG(38:6) | C ₄₄ H ₇₅ O ₁₀ P | 794,509 8 | 5,09 | 1 | [M-H]- | 11,14 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,56 | 1,2 9 | 1,01E-02 | 1,30 | - | - | 0,83 | - | - |
| PG(38:5) | C ₄₄ H ₇₇ O ₁₀ P | 796,525 4 | 5,07 | 2 | [M-H]- | 11,36 | HILIC- LC- | 2,66 | 1,4 6 | 5,05E-03 | 1,76 | 1,1 6 | - | 0,66 | 1,0 9 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|--|----------|-------|---|--------|-------|------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|-----------|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | |
| PG(40:5) | C ₄₆ H ₈₁ O ₁₀ P | 824,5567 | 5,07 | 4 | [M-H]- | 11,67 | HILIC-LC-QTOF-MS | 3,01 | 1,15 | - | 3,56 | 1,38 | 3,51E-02 | 1,18 | - | - |
| PG(40:6) | C ₄₆ H ₇₉ O ₁₀ P | 822,5411 | 3,54 | 6 | [M-H]- | 15,38 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,69 | 1,07 | - | 1,56 | 1,03 | - | 2,26 | 1,10 | 2,95E-02 |
| LPS(18:1) | C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P | 523,291 | 23,41 | 2 | [M-H]- | 4,43 | RP-LC-QTOF-MS | 0,89 | - | - | 3,10 | - | - | 0,29 | 1,02 | - |
| LPS(O-19:0) | C ₂₆ H ₅₄ NO ₉ P | 555,3536 | 13,67 | 2 | [M-H]- | 12,74 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,89 | 1,31 | 1,77E-02 | 1,27 | - | - | 0,67 | 1,07 | - |
| LPS(22:0) | C ₂₈ H ₅₆ NO ₉ P | 581,3693 | 13,43 | 1 | [M-H]- | 17,88 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,92 | 1,41 | 1,77E-02 | 1,37 | 1,15 | - | 0,72 | 1,06 | - |
| PS(33:0) | C ₃₉ H ₇₆ NO ₁₀ P | 749,5207 | 3,25 | 1 | [M-H]- | 13,26 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,21 | 1,22 | 5,05E-03 | 1,53 | - | - | 7,16 | 1,34 | 2,46E-02* |
| PS(34:0) | C ₄₀ H ₇₈ NO ₁₀ P | 763,5363 | 10,95 | 2 | [M-H]- | 9,03 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,39 | 1,51 | 2,53E-03 | 1,10 | - | - | 2,86 | 1,17 | 1,86E-02 |
| PS(34:1) | C ₄₀ H ₇₆ NO ₁₀ P | 761,5207 | 9,62 | 2 | [M-H]- | 17,64 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,33 | - | - | 2,14 | 1,37 | 1,40E-02 | 1,61 | 1,01 | - |
| PS(36:1) | C ₄₂ H ₈₀ NO ₁₀ P | 789,552 | 10,87 | 2 | [M-H]- | 7,49 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,37 | 1,58 | 2,53E-03 | 0,93 | - | - | 2,52 | 1,24 | 3,44E-02* |
| PS(36:2) | C ₄₂ H ₇₈ NO ₁₀ P | 787,5363 | 9,53 | 1 | [M-H]- | 17,15 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,32 | - | - | 2,28 | 1,46 | 5,91E-03 | 1,73 | 1,07 | 2,95E-02 |
| PS(37:0) | C ₄₃ H ₈₄ NO ₁₀ P | 805,5833 | 10,83 | 1 | [M-H]- | 6,63 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,45 | 1,44 | 5,05E-03 | 0,93 | - | - | 2,05 | 1,12 | 2,64E-02 |
| PS(O-37:0) | C ₄₄ H ₈₈ NO ₉ P | 805,6197 | 10,84 | 3 | [M-H]- | 8,10 | HILIC-LC- | 0,97 | - | - | 1,75 | 1,53 | 9,32E-03 | 1,80 | 1,35 | 2,46E-02* |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|--|----------|-------|---|--------|------|------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|-----------|--|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | | |
| PS(P-38:0) | C ₄₄ H ₈₆ NO ₉ P | 803,604 | 10,7 | 3 | [M-H]- | 7,94 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,73 | 1,07 | - | 1,36 | 1,21 | - | 1,87 | 1,33 | 2,46E-02* | |
| PS(38:1) | C ₄₄ H ₈₄ NO ₁₀ P | 817,5833 | 10,8 | 1 | [M-H]- | 7,60 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,48 | 1,51 | 5,05E-03 | 1,11 | - | - | 2,30 | 1,35 | 2,46E-02* | |
| PS(39:1) | C ₄₅ H ₈₆ NO ₁₀ P | 831,5989 | 10,75 | 2 | [M-H]- | 7,12 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,56 | 1,46 | 5,05E-03 | 1,17 | - | - | 2,08 | 1,41 | 2,46E-02* | |
| PS(39:0) | C ₄₅ H ₈₈ NO ₁₀ P | 833,6146 | 10,76 | 3 | [M-H]- | 8,27 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,84 | - | - | 1,19 | - | - | 1,42 | 1,24 | 1,86E-02 | |
| PS(40:1) | C ₄₆ H ₈₈ NO ₁₀ P | 845,6146 | 10,72 | 2 | [M-H]- | 7,59 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,58 | 1,33 | 1,77E-02 | 1,28 | 1,18 | - | 2,21 | 1,45 | 2,46E-02* | |
| PS(40:2) | C ₄₆ H ₈₆ NO ₁₀ P | 843,5989 | 10,73 | 2 | [M-H]- | 7,80 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,55 | 1,44 | 5,05E-03 | 1,11 | - | - | 2,00 | 1,36 | 3,44E-02* | |
| PS(40:4) | C ₄₆ H ₈₂ NO ₁₀ P | 839,5676 | 10,67 | 1 | [M-H]- | 6,89 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,43 | 1,56 | 2,53E-03 | 0,81 | 1,14 | - | 1,88 | 1,11 | - | |
| PS(P-40:0) | C ₄₆ H ₉₀ NO ₉ P | 831,6353 | 10,75 | 4 | [M-H]- | 6,98 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,82 | - | - | 1,36 | 1,27 | 2,89E-02 | 1,65 | 1,36 | 2,46E-02* | |
| PS(P-40:3) | C ₄₆ H ₈₄ NO ₉ P | 825,5884 | 10,56 | 2 | [M-H]- | 3,27 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,64 | 1,24 | 4,80E-02 | 1,20 | - | - | 1,87 | 1,15 | 4,51E-02 | |
| PS(42:3) | C ₄₈ H ₈₈ NO ₁₀ P | 869,6146 | 10,58 | 3 | [M-H]- | 7,85 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,68 | 1,20 | 4,80E-02 | 1,10 | - | - | 1,63 | 1,14 | 2,95E-02 | |
| PS(O-42:4) | C ₄₈ H ₈₈ NO ₉ P | 853,6197 | 10,61 | 3 | [M-H]- | 7,43 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,89 | - | - | 1,63 | 1,45 | 1,40E-02 | 1,82 | 1,30 | 1,09E-02 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--|--------------|-----------|---|--|-------|------------------------------|------|----------|----------|------|----------|---------------|------|----------|---------------|
| PS(42:1) | C ₄₈ H ₉₂ NO ₁₀ P | 873,645 9 | 10,6 7 | 3 | [M-H]- | 8,39 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,65 | 1,2 3 | 1,01E-02 | 1,15 | - | - | 1,76 | 1,2 9 | 2.46E -02* |
| PS(44:4) | C ₅₀ H ₉₀ NO ₁₀ P | 895,630 2 | 10,5 6 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 7,19 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,90 | - | - | 1,88 | 1,6 1 | 5,91E -03 | 2,10 | 1,3 6 | 2.46E -02* |
| PC(P-38:3) | C ₄₈ H ₈₆ NO ₇ P | 795,614 2 | | 2 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PS(42:4) | C ₄₈ H ₈₆ NO ₁₀ P | 867,598 9 | 10,6 | 2 | [M-H]- | 8,15 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,62 | 1,3 2 | 1,77E-02 | 1,14 | - | - | 1,83 | 1,1 5 | 4.51E -02 |
| PE-NMe(38:2) | C ₄₄ H ₈₄ NO ₈ P | 785,593 5 | | 2 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PS(40:3) | C ₄₆ H ₈₄ NO ₁₀ P | 841,583 3 | 10,6 6 | 2 | [M-H]- | 7,64 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,55 | 1,4 1 | 1,01E-02 | 0,97 | - | - | 1,76 | 1,0 8 | - |
| PC(34:1) | C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P | 759,577 8 | | 2 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PS(44:5) | C ₅₀ H ₈₈ NO ₁₀ P | 893,614 6 | 10,5 5 | 2 | [M-H]- | 7,97 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,72 | 1,1 0 | - | 1,29 | 1,0 8 | - | 1,79 | 1,2 6 | 3.44E -02* |
| PE(41:3) | C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P | 811,609 1 | | 2 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PS(42:3) | C ₄₈ H ₈₈ NO ₁₀ P | 869,614 6 | 10,6 2 | 2 | [[M-H]-H ₂ O]- | 7,57 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,75 | 1,0 0 | - | 1,66 | 1,4 5 | 2,89E -02 | 2,21 | 1,3 5 | 2.46E -02* |
| PC(P-36:2) | C ₄₄ H ₈₄ NO ₇ P | 769,598 5 | | 1 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| LPI(18:1) | C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P | 598,311 8 | 10,6 2 | 2 | [M-H]- | 14,87 | HILIC- LC- | 1,61 | 1,1 5 | 3,03E-02 | 4,44 | 1,7 5 | 9.36E -03* | 2,76 | 1,2 5 | 2.46E -02* |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|----------|-------|---|--------------------------------|-------|------------------|------|------|----------|------|------|-----------|------|------|-----------|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | |
| LPI(18:1) | C ₂₇ H ₅₁ O ₁₂ P | 598,3118 | 23,97 | 2 | [M-H]- | 4,73 | RP-LC-QTOF-MS | 1,96 | - | - | 3,65 | 1,27 | | 0,54 | 1,22 | |
| LPI(18:0) | C ₂₇ H ₅₃ O ₁₂ P | 600,3275 | 10,55 | 1 | [M-H]- | 15,55 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,29 | 1,00 | - | 3,05 | 1,71 | 1.50E-02* | 2,37 | 1,24 | 3.44E-02* |
| LPI(20:3) | C ₂₉ H ₅₁ O ₁₂ P | 622,3118 | 10,42 | 2 | [M-H]- | 15,88 | HILIC-LC-QTOF-MS | - | - | - | - | 1,96 | 9.36E-03* | - | 1,49 | 2.46E-02* |
| LPI(20:4) | C ₂₉ H ₄₉ O ₁₂ P | 620,2962 | 10,52 | 1 | [M-H]- | 16,23 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,09 | - | - | 2,71 | 1,64 | 4.03E-02* | 2,50 | 1,31 | 2.46E-02* |
| LPI(20:2) | C ₂₉ H ₅₃ O ₁₂ P | 624,3275 | 10,45 | 3 | [M-H]- | 17,01 | HILIC-LC-QTOF-MS | - | - | - | - | 2,08 | 9.36E-03* | - | 1,56 | 2.46E-02* |
| PI(34:1) | C ₄₃ H ₈₁ O ₁₃ P | 836,5415 | 7,83 | 2 | [M-H]- | 13,33 | HILIC-LC-QTOF-MS | 4,28 | 1,44 | 5,05E-03 | 3,32 | 1,57 | 3,73E-03 | 0,78 | - | - |
| PI(36:3) | C ₄₅ H ₈₁ O ₁₃ P | 860,5415 | 7,73 | 3 | [M-H]- | 14,73 | HILIC-LC-QTOF-MS | 2,46 | 1,37 | 1,01E-02 | 2,61 | 1,50 | 5,91E-03 | 1,06 | - | - |
| PI(38:6) | C ₄₇ H ₇₉ O ₁₃ P | 882,5258 | 7,56 | 2 | [M-H]- | 13,69 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,99 | 1,36 | 1,01E-02 | 2,07 | 1,44 | 1,40E-02 | 1,04 | - | - |
| PI(38:5) | C ₄₇ H ₈₁ O ₁₃ P | 884,5415 | 7,53 | 1 | [M-H]- | 13,52 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,43 | 1,00 | - | 2,24 | 1,35 | 2,05E-02 | 1,56 | - | - |
| PI(37:3) | C ₄₆ H ₈₃ O ₁₃ P | 874,5571 | 3,84 | 4 | [[M-H]-H ₂ O]- | 15,26 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,63 | 1,36 | 1,01E-02 | 1,38 | - | - | 2,19 | - | - |
| PG(36:2) | C ₄₂ H ₇₉ O ₁₀ P | 774,5411 | | 2 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | | HILIC-LC-QTOF-MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PI(36:2) | C ₄₅ H ₈₃ O ₁₃ P | 862,5571 | 7,73 | 2 | [M-H]- | 14,83 | HILIC-LC- | 2,69 | 1,34 | 1,01E-02 | 3,24 | 1,65 | 4.03E-02* | 1,20 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|----------|-------|---|---------|-------|------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|-----------|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | |
| PG(40:4) | C ₄₆ H ₈₃ O ₁₀ P | 826,5724 | | 7 | [M+Cl]- | | HILIC-LC-QTOF-MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| LPE O-16:1 | C ₂₁ H ₄₄ NO ₆ P | 437,2906 | 23,24 | 2 | [M-H]- | 7,23 | RP-LC-QTOF-MS | 1,73 | 1,13 | - | 1,69 | 1,08 | | 1,02 | 1,14 | |
| LPE(18:1) | C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P | 479,3012 | 22,88 | 2 | [M-H]- | 5,96 | RP-LC-QTOF-MS | 1,73 | 1,42 | - | 1,46 | 1,03 | | 1,18 | 1,25 | |
| LPE (18:1) | C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P | 479,3012 | 23,17 | 2 | [M-H]- | 8,42 | RP-LC-QTOF-MS | 0,80 | - | - | 1,85 | 1,11 | | 0,43 | 1,66 | |
| LPE(18:0) | C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P | 481,3168 | 22,88 | 2 | [M-H]- | 6,10 | RP-LC-QTOF-MS | 2,27 | 1,53 | - | 1,46 | - | | 1,55 | 1,56 | |
| LPE(20:1) | C ₂₅ H ₅₀ NO ₇ P | 507,3325 | 23,25 | 2 | [M-H]- | 9,02 | RP-LC-QTOF-MS | 1,84 | 1,04 | - | 1,62 | - | | 1,13 | - | |
| LPE(20:4) | C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P | 501,2855 | 21,99 | 2 | [M-H]- | 4,87 | RP-LC-QTOF-MS | 0,96 | - | - | 1,45 | - | | 0,66 | 1,21 | |
| LPE(22:6) | C ₂₇ H ₄₄ NO ₇ P | 525,2855 | 21,94 | 2 | [M-H]- | 6,05 | RP-LC-QTOF-MS | 1,12 | - | - | 1,68 | 1,00 | | 0,67 | 1,23 | |
| PE(O-25:1) | C ₃₀ H ₅₈ NO ₉ P | 607,3849 | 16,22 | 8 | [M+H]+ | 2,36 | RP-LC-QTOF-MS | 1,67 | - | - | 2,46 | 1,74 | 4,84E-02 | 1,47 | 1,47 | - |
| PE(32:2) | C ₃₇ H ₇₀ NO ₈ P | 687,4839 | 9 | 1 | [M-H]- | 13,01 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,53 | 1,18 | 4,80E-02 | 1,89 | 1,28 | 4,01E-02 | 3,54 | 1,27 | 2,46E-02* |
| PE(32:1) | C ₃₇ H ₇₂ NO ₈ P | 689,4996 | 9 | 1 | [M-H]- | 14,93 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,49 | 1,06 | - | 1,73 | 1,06 | - | 3,55 | 1,20 | 2,46E-02* |
| PE(P-32:1) | C ₃₇ H ₇₂ NO ₇ P | 673,5046 | 8,86 | 1 | [M-H]- | 14,98 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,56 | 1,11 | - | 1,40 | - | - | 2,50 | 1,07 | 1,86E-02 |
| PE(P-34:2) | C ₃₉ H ₇₄ NO ₇ P | 699,5203 | 8,78 | 2 | [M-H]- | 11,80 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,54 | 1,14 | - | 1,16 | - | - | 2,15 | 1,01 | 2,95E-02 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|---|--------------|-----------|---|--|-------|------------------------------|------|----------|----------|------|----------|--------------|------|----------|---------------|
| PE(36:4) | C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P | 739,515 2 | 8,76 | 2 | [M-H]- | 13,46 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,82 | - | - | 1,73 | 1,2 0 | - | 2,11 | 1,1 4 | 1,86E -02 |
| PE(37:4) | C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P | 753,530 9 | 3,24 | 5 | [M-H]- | 18,81 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,57 | - | - | 1,86 | 1,1 2 | - | 3,25 | 1,1 9 | 2,46E -02* |
| PE(38:6) | C ₄₃ H ₇₄ NO ₈ P | 763,515 2 | 8,71 | 1 | [M-H]- | 12,67 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,62 | 1,2 1 | - | 1,60 | 1,3 3 | 4,01E -02 | 2,58 | 1,3 3 | 2,46E -02* |
| PE(38:4) | C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P | 767,546 5 | 8,68 | 2 | [M-H]- | 13,57 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,77 | - | - | 1,54 | 1,0 6 | - | 2,01 | 1,1 3 | 1,86E -02 |
| PE(38:5) | C ₄₃ H ₇₆ NO ₈ P | 765,530 9 | 8,68 | 2 | [M-H]- | 13,55 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,82 | - | - | 1,82 | 1,4 8 | 1,40E -02 | 2,22 | 1,2 9 | 2,46E -02* |
| PE(39:5) | C ₄₄ H ₇₈ NO ₈ P | 779,546 5 | 8,54 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 15,10 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,06 | - | - | 1,58 | 1,2 4 | - | 1,49 | 1,0 4 | - |
| PE(P-40:6) | C ₄₅ H ₇₈ NO ₇ P | 775,551 6 | 8,5 | 3 | [M-H]- | 15,46 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,16 | - | - | 1,73 | 1,3 4 | 4,01E -02 | 1,50 | 1,0 1 | - |
| PE(40:6) | C ₄₅ H ₇₈ NO ₈ P | 791,546 5 | 8,64 | 3 | [M-H]- | 13,01 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,81 | - | - | 1,66 | 1,2 9 | 2,89E -02 | 2,06 | 1,2 3 | 3,44E -02* |
| PE(40:7) | C ₄₅ H ₇₆ NO ₈ P | 789,530 9 | 8,64 | 2 | [M-H]- | 13,40 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,74 | 1,0 2 | - | 1,60 | 1,4 1 | 2,05E -02 | 2,14 | 1,3 3 | 2,46E -02* |
| PE(P-40:7) | C ₄₅ H ₇₆ NO ₇ P | 773,535 9 | 8,5 | 1 | [M-H]- | 15,99 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,91 | - | - | 1,48 | 1,0 7 | - | 1,64 | 1,0 7 | 4,51E -02 |
| PE(41:4) | C ₄₆ H ₈₄ NO ₈ P | 809,593 5 | 10,5 4 | 2 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | 7,64 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,61 | 1,2 4 | 4,80E-02 | 1,38 | 1,0 7 | - | 2,28 | 1,2 6 | 3,44E -02* |
| PE(44:12) | C ₄₉ H ₇₄ NO ₈ P | 835,515 2 | 8,84 | 9 | [[M- H]+CH ₃ COONa]- | 19,84 | HILIC- LC- | 0,53 | 1,0 4 | - | 1,35 | - | - | 2,56 | 1,1 6 | 2,46E -02* |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|----------|-------|---|--------------------------------|-------|------------------|------|------|-----------|------|------|----------|------|------|-----------|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | |
| PE(36:5) | C ₄₁ H ₇₂ NO ₈ P | 737,4996 | 8,76 | 1 | [M-H]- | 12,60 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,86 | - | - | 2,19 | 1,59 | 5,91E-03 | 2,53 | 1,30 | 3,44E-02* |
| PE(36:4) | C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P | 739,5152 | 8,64 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 13,21 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,45 | 1,33 | 3,03E-02 | 1,07 | - | - | 2,37 | 1,22 | 1,09E-02 |
| PC(33:4) | C ₄₁ H ₇₄ NO ₈ P | 739,5152 | | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | | HILIC-LC-QTOF-MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PE(38:2) | C ₄₃ H ₈₂ NO ₈ P | 771,5778 | 8,79 | 4 | [M-H]- | 11,60 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,64 | - | - | 1,43 | - | - | 2,23 | 1,11 | 3,44E-02* |
| PA(33:0) | C ₃₆ H ₇₁ O ₈ P | 662,4887 | 5,3 | 2 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 10,94 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,78 | 1,39 | 1,01E-02 | 1,24 | - | - | 0,69 | 1,06 | - |
| LPC(O-16:0) | C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P | 481,3532 | 23,31 | 3 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 4,64 | RP-LC-QTOF-MS | 1,44 | - | - | 2,79 | 1,49 | | 0,52 | 1,58 | |
| LPC(O-16:0) | C ₂₄ H ₅₂ NO ₆ P | 481,3532 | 23,34 | 6 | [M+H]+ | 5,44 | RP-LC-QTOF-MS | 1,58 | - | - | 2,76 | 2,03 | - | 1,75 | 1,82 | 4,90E-02 |
| LPC(O-18:1) | C ₂₆ H ₅₄ NO ₆ P | 507,3689 | 23,68 | 3 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 5,38 | RP-LC-QTOF-MS | 2,02 | 1,01 | 0,0363636 | 2,13 | 1,12 | | 0,95 | - | |
| LPC(16:0) | C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P | 495,3325 | 22,88 | 2 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 6,08 | RP-LC-QTOF-MS | 2,25 | 3,01 | - | 1,45 | 1,62 | | 1,55 | 3,10 | |
| LPC(16:0) | C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P | 495,3325 | 22,58 | 2 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 5,20 | RP-LC-QTOF-MS | 1,33 | - | - | 1,47 | - | | 0,90 | 1,01 | |
| LPC(16:0) | C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P | 495,3325 | 22,9 | 5 | [M+H]+ | 5,65 | RP-LC-QTOF-MS | 2,68 | 3,61 | - | 1,40 | 1,66 | - | 0,52 | 3,60 | 4,90E-02 |
| LPC(16:1) | C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P | 493,3168 | 21,53 | 1 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 7,95 | RP-LC-QTOF-MS | 0,68 | - | - | 1,39 | - | | 0,49 | 1,02 | |
| LPC(18:1) | C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P | 521,3481 | 23,25 | 2 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 8,02 | RP-LC-QTOF-MS | 1,85 | 2,28 | - | 1,61 | 1,87 | | 1,15 | 1,81 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--|--------------|-----------|---|--|-------|------------------------------|------|----------|---------------|------|----------|--------------|------|----------|---------------|
| LPC(18:1) | C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P | 521,348 1 | 22,9 8 | 2 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 6,14 | RP-LC- QTOF- MS | 0,83 | 1,1 4 | - | 1,45 | 1,4 2 | | 0,58 | 2,0 8 | |
| LPC(18:1) | C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P | 521,348 1 | 23,2 8 | 5 | [M+H] ⁺ | 10,08 | RP-LC- QTOF- MS | 2,88 | 3,1 7 | - | 1,65 | 1,8 8 | - | 0,57 | 2,8 1 | 4,90E -02 |
| LPC(18:1) | C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P | 521,348 1 | 22,2 8 | 9 | [M+H] ⁺ | 12,39 | RP-LC- QTOF- MS | 2,69 | 1,4 3 | - | 1,21 | - | - | 0,45 | 1,5 1 | 4,90E -02 |
| LPC(18:2) | C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P | 519,332 5 | 22,2 8 | 5 | [M+H] ⁺ | 19,96 | RP-LC- QTOF- MS | 2,73 | 1,1 8 | - | 1,45 | - | - | 0,53 | 1,1 3 | 4,90E -02 |
| LPC(22:6) | C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P | 567,332 5 | 22,1 8 | 2 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 4,44 | RP-LC- QTOF- MS | 2,68 | 1,2 7 | 0,036363 6 | 1,20 | - | | 2,23 | 1,5 8 | 2,80E -02 |
| LPC(20:3) | C ₂₈ H ₅₂ NO ₇ P | 545,348 1 | 22,8 2 | 4 | [M+H] ⁺ | 11,57 | RP-LC- QTOF- MS | 3,68 | - | - | 1,39 | - | - | 0,38 | 1,0 3 | 4,90E -02 |
| LPC(20:4) | C ₂₈ H ₅₀ NO ₇ P | 543,332 5 | 22,2 8 | 4 | [M+H] ⁺ | 13,83 | RP-LC- QTOF- MS | 3,39 | 1,6 7 | - | 1,37 | - | - | 0,40 | 1,7 3 | 4,90E -02 |
| LPC(22:6) | C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P | 567,332 5 | 22,2 | 4 | [M+H] ⁺ | 5,21 | RP-LC- QTOF- MS | 3,19 | 1,3 4 | - | 1,20 | - | - | 0,38 | 1,4 7 | 4,90E -02 |
| LPC(22:5) | C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P | 569,348 1 | 22,5 7 | 5 | [M+H] ⁺ | 7,30 | RP-LC- QTOF- MS | 3,17 | 1,5 9 | - | 1,12 | - | - | 0,35 | 1,7 9 | 4,90E -02 |
| PC(33:3) | C ₄₁ H ₇₆ NO ₈ P | 741,530 9 | 8,85 | 2 | [M-H] ⁻ | 13,38 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,54 | 1,2 0 | - | 1,60 | 1,2 2 | - | 2,99 | 1,3 0 | 2,46E -02* |
| PC(36:3) | C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P | 783,577 8 | 10,6 2 | 2 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 7,66 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,52 | 1,4 8 | 5,05E-03 | 1,06 | - | - | 2,04 | 1,2 5 | 1,09E -02 |
| PE(39:3) | C ₄₄ H ₈₂ NO ₈ P | 783,577 8 | | 2 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PC(40:6) | C ₄₈ H ₈₄ NO ₇ P | 817,598 5 | 5,9 | 8 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 14,06 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,15 | - | - | 2,34 | 1,5 4 | 5,91E -03 | 2,04 | 1,2 4 | 1,09E -02 |
| PS(42:5) | C ₄₈ H ₈₄ NO ₁₀ P | 865,583 3 | | 2 | [M-H] ⁻ | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|---|--------------|-----------|----|---------------------------|-------|------------------------------|------|----------|----------|------|----------|---------------|------|----------|---------------|
| PC(P-32:1) | C ₄₀ H ₇₈ NO ₇ P | 715,551 6 | 3,22 | 9 | [M-H]- | 15,21 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,51 | - | - | 1,68 | - | - | 3,27 | 1,1 2 | 2.46E -02* |
| PE(P-35:1) | C ₄₀ H ₇₈ NO ₇ P | 715,551 6 | | 9 | [M-H]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PC(34:4) | C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P | 753,530 9 | 8,59 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 12,85 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,64 | 1,1 3 | - | 1,10 | - | - | 1,72 | 1,1 2 | 4.51E -02 |
| PE(37:4) | C ₄₂ H ₇₆ NO ₈ P | 753,530 9 | | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PC(42:7) | C ₅₀ H ₈₆ NO ₈ P | 859,609 1 | 5,91 | 10 | [M-H]- | 12,28 | HILIC- LC- QTOF- MS | ONLY | - | - | - | 1,9 8 | 9.36E -03* | - | 1,5 1 | 2.46E -02* |
| PE-NMe(44:7) | C ₅₀ H ₈₆ NO ₈ P | 859,609 1 | | 10 | [M-H]- | | HILIC- LC- QTOF- MS | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CDP-DG(i-31:0) | C ₄₃ H ₇₉ N ₃ O ₁₅ P ₂ | 939,498 6 | 8,68 | 4 | [M-H]- | 16,04 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,83 | - | - | 1,64 | 1,2 4 | 4,01E -02 | 1,99 | 1,2 4 | 2.46E -02* |
| Hydroxy acids and derivatives | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lactic acid | C ₃ H ₆ O ₃ | 90,0317 | 14,9 7 | 3 | [[M-H]-H ₂ O]- | 8,26 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,77 | - | - | 1,30 | 1,0 4 | - | 1,69 | 1,1 3 | 3.44E -02* |
| Galactonate | C ₆ H ₁₂ O ₇ | 196,058 3 | 13,3 9 | 3 | [M-H]- | 14,22 | HILIC- LC- QTOF- MS | 0,47 | 1,1 8 | 3,03E-02 | 1,01 | - | - | 2,17 | 1,3 7 | 2.46E -02* |
| Imidazopyrimidines | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hypoxanthine | C ₅ H ₄ N ₄ O | 136,038 5 | 5,44 | 3 | [M-H]- | 2,97 | HILIC- LC- QTOF- MS | 1,23 | - | - | 0,39 | 1,4 2 | 2,05E -02 | 0,32 | 1,3 2 | 1,09E -02 |
| Indoles and derivatives | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hydroxy-tryptophan | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₃ | 220,084 8 | 12,3 4 | 2 | [M-H]- | 16,20 | HILIC- LC- | 0,37 | 1,5 0 | 2,53E-03 | 0,70 | 1,1 4 | - | 1,92 | 1,0 6 | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|--------------|-----------|---|--------------------------------|-------|------------------|------|----------|----------|------|----------|--------------|------|----------|---------------|--|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | | |
| Indoleacrylic acid | C ₁₁ H ₉ NO ₂ | 187,063 3 | 11,0 3 | 2 | [M-H]- | 12,63 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,2 1 | 3,03E-02 | 0,82 | - | - | 2,70 | 1,1 5 | - | |
| Methoxytryptophol | C ₁₁ H ₁₃ NO ₂ | 191,094 6 | 3,19 | 1 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 9,10 | RP-LC-QTOF-MS | 0,31 | 1,0 8 | - | 0,40 | 1,0 6 | | 0,78 | - | | |
| Indole | C ₈ H ₇ N | 117,057 8 | 6,98 | 4 | [M-H]- | 3,46 | RP-LC-QTOF-MS | 0,98 | 1,3 6 | - | 1,10 | 1,4 8 | | 0,89 | 1,6 7 | | |
| Organic phosphoric acids and derivatives | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glycerophosphoglycerol | C ₆ H ₁₅ O ₈ P | 246,050 5 | 13,6 9 | 2 | [M-H]- | 10,50 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,47 | 1,4 6 | 2,53E-03 | 0,96 | - | - | 2,04 | 1,4 3 | 2,46E -02* | |
| Organic sulfonic acids and derivatives | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acetyltaurine | C ₄ H ₉ NO ₄ S | 167,025 2 | 3,7 | 3 | [M-H]- | 6,00 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,42 | 1,3 9 | 1,01E-02 | 0,89 | - | - | 2,14 | 1,3 3 | 3,44E -02* | |
| Taurine | C ₂ H ₇ NO ₃ S | 125,014 7 | 13,3 1 | 2 | [M-H]- | 3,70 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,81 | 1,0 6 | - | 1,23 | 1,2 6 | 2,89E -02 | 1,53 | 1,4 3 | 2,46E -02* | |
| Methoxycatechol-sulphate | C ₇ H ₈ O ₅ S | 204,009 2 | 1,16 | 3 | [M-H]- | 13,83 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,32 | 1,4 1 | 2,53E-03 | 0,91 | - | - | 2,82 | 1,5 3 | 2,46E -02* | |
| Organoxygen compounds | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Acetylmuramoyl-Ala | C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₉ | 364,148 2 | 1,79 | 3 | [[M-H]+CH ₃ COONa]- | 7,87 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,3 8 | 2,53E-03 | 1,09 | - | - | 3,60 | 1,2 7 | 2,46E -02* | |
| Acetylneuraminic acid | C ₁₁ H ₁₉ NO ₉ | 309,106 | 14,2 | 2 | [M-H]- | 11,72 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,68 | 1,2 4 | 3,03E-02 | 1,13 | - | - | 1,66 | 1,2 7 | 3,44E -02* | |
| Deoxy-glycero-galactono-ulosonic acid | C ₉ H ₁₆ O ₉ | 268,079 4 | 13,3 1 | 0 | [[M-H]-H ₂ O]- | 13,98 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,30 | 1,1 7 | - | 0,35 | 1,3 4 | - | 1,17 | - | - | |
| Pantothenate | C ₉ H ₁₇ NO ₅ | 219,110 7 | 12,4 9 | 2 | [M-H]- | 2,77 | HILIC-LC- | 0,43 | 1,4 7 | 5,05E-03 | 1,23 | - | - | 2,83 | 1,4 0 | 2,46E -02* | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|---|----------|-------|---|--|-------|------------------|------|------|----------|------|------|----------|-------|------|-----------|--|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | | |
| Glycerol | C ₃ H ₈ O ₃ | 92,0473 | 15,87 | 3 | [[M-H]-H ₂ O]- | 18,33 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,66 | 1,19 | 1,77E-02 | 0,82 | - | - | 1,25 | - | - | |
| Deoxy-glycero-galactononulosonic acid | C ₉ H ₁₆ O ₉ | 268,0794 | 3,69 | 2 | [[M-H]-H ₂ O]- | 10,21 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,49 | 1,17 | - | 0,82 | - | - | 1,67 | 1,16 | 4,51E-02 | |
| Acetyl-glucosaminyldiphosphodolic hol | C ₂₃ H ₄₃ NO ₁₂ P ₂ | 587,226 | 22,15 | 1 | [M+H] ⁺ | 2,70 | RP-LC-QTOF-MS | ONLY | 1,11 | - | - | - | - | 0,00 | 1,30 | 4,20E-02 | |
| Deoxy-fructosylisoleucine | C ₁₂ H ₂₃ NO ₇ | 293,1475 | 1,94 | 4 | [M+H] ⁺ | 14,23 | RP-LC-QTOF-MS | 0,32 | 4,04 | 3,64E-02 | 0,35 | 4,23 | 1,76E-02 | 1,10 | - | - | |
| Pantothenate | C ₉ H ₁₇ NO ₅ | 219,1107 | 3,86 | 1 | [M-H]- | 6,07 | RP-LC-QTOF-MS | 0,50 | 1,97 | - | 1,32 | 1,69 | - | 0,38 | 3,49 | 4,90E-02 | |
| Phenylpropanoic acids | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dihydroxyphenyl propanoic acid | C ₉ H ₁₀ O ₄ | 182,0579 | 6,76 | 3 | [M-H]- | 3,01 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,40 | 1,43 | 1,01E-02 | 0,94 | - | - | 2,37 | 1,37 | 2,46E-02* | |
| Pteridines | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Methyltetrahydrofolic acid | C ₂₀ H ₂₅ N ₇ O ₆ | 459,1866 | 5,08 | 4 | [[M-H] ⁺ +CH ₃ COONa] ⁻ | 17,00 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,54 | 1,39 | 1,77E-02 | 1,20 | - | - | 2,23 | 1,23 | 2,46E-02* | |
| Xanthopterin-B2 | C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₄ | 238,0702 | 14,85 | 8 | [M+Cl] ⁻ | 15,82 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,08 | 1,16 | 2,53E-03 | 1,27 | - | - | 15,97 | 1,00 | 2,46E-02* | |
| Pyrimidine nucleosides | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Uridine | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆ | 244,0695 | 4,75 | 2 | [M-H]- | 2,98 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,46 | 1,37 | 1,01E-02 | 0,75 | 1,24 | - | 1,63 | 1,24 | 1,86E-02 | |
| Sphingolipids | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HexCer 37:2;O3 | C ₄₃ H ₈₁ NO ₉ | 755,5911 | 10,87 | 2 | [M+Cl] ⁻ | 7,92 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,54 | 1,33 | 1,77E-02 | 1,25 | - | - | 2,31 | 1,25 | 3,44E-02* | |
| LacCer(d34:1) | C ₄₆ H ₈₇ NO ₁₃ | 861,6177 | 5,9 | 2 | [M-H]- | 11,73 | HILIC-LC- | 1,30 | - | - | 2,71 | 1,57 | 9,32E-03 | 2,09 | 1,24 | 3,44E-02* | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|----------|-------|---|--|-------|------------------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|----------|
| | | | | | | | QTOF-MS | | | | | | | | | |
| Cer(d40:0) | C ₄₀ H ₈₁ NO ₃ | 623,6216 | 1,66 | 3 | [[M-H] ⁺ +CH ₃ COONa] ⁻ | 7,73 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,46 | - | - | 2,60 | 1,33 | 2,05E-02 | 1,79 | - | - |
| Cer(d34:1) | C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ | 537,5121 | 1,71 | 3 | [M-H] ⁻ | 9,56 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,68 | 1,14 | 4,80E-02 | 2,21 | 1,12 | - | 1,31 | - | - |
| Lactosylceramide (d42:2) | C ₅₄ H ₁₀₁ NO ₁₃ | 971,7273 | 5,46 | 5 | [M+Cl] ⁻ | 14,24 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,48 | - | - | 5,54 | 1,69 | 3,91E-02 | 3,74 | 1,25 | 9,32E-03 |
| Glucosylceramide (d42:2) | C ₄₈ H ₉₁ NO ₈ | 809,6745 | 2,43 | 3 | [M+Cl] ⁻ | 14,19 | HILIC-LC-QTOF-MS | 1,84 | - | - | 4,21 | 1,21 | 3,51E-02 | 2,28 | - | - |
| SPB (O-17:1) | C ₁₇ H ₃₅ NO ₂ | 285,2668 | 21,16 | 5 | [M+H] ⁺ -H ₂ O | 10,11 | RP-LC-QTOF-MS | 0,35 | - | 9,09E-03 | 1,12 | - | - | 3,22 | 1,18 | 4,90E-02 |
| Sphingosine-1-phosphate | C ₁₉ H ₄₀ NO ₅ P | 393,2644 | 20,95 | 4 | [[M-H]-H ₂ O] ⁻ | 1,86 | RP-LC-QTOF-MS | 0,04 | 4,63 | - | 0,32 | - | - | 0,13 | - | - |
| Sterol Lipids | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hydroxycholesterol sulfate | C ₂₇ H ₄₆ O ₅ S | 482,3066 | 1,2 | 4 | [M-H] ⁻ | 17,99 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,49 | 1,18 | 5,05E-03 | 0,79 | - | - | 1,60 | 1,16 | 1,86E-02 |
| Dehydroecdysone | C ₂₇ H ₄₂ O ₆ | 462,2981 | 1,66 | 5 | [[M-H] ⁺ +CH ₃ COONa] ⁻ | 8,17 | HILIC-LC-QTOF-MS | 0,94 | - | - | 1,48 | 1,20 | 2,05E-02 | 1,57 | 1,11 | - |
| Cholesterol | C ₂₇ H ₄₆ O | 386,3549 | 23,75 | 5 | [M+H] ⁺ -H ₂ O | 17,21 | RP-LC-QTOF-MS | 0,93 | - | - | 0,78 | 1,54 | 8,79E-03 | 0,83 | 1,38 | 6,99E-03 |
| Carnitine | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tetradecanoylcarnitine | C ₂₁ H ₄₁ NO ₄ | 371,3036 | 21,72 | 6 | [M+H] ⁺ | 6,40 | RP-LC-QTOF-MS | 7,51 | 1,04 | - | 1,39 | - | - | 0,19 | 1,19 | 1,40E-02 |
| Hydroxybutyrylcarnitine | C ₁₁ H ₂₁ NO ₅ | 247,142 | 1,94 | 4 | [M+H] ⁺ | 15,03 | RP-LC-QTOF-MS | 0,32 | 2,03 | - | 0,36 | 2,11 | 3,08E-02 | 1,11 | - | - |
| Glutaryl carnitine | C ₁₂ H ₂₁ NO ₆ | 275,1369 | 1,98 | 4 | [M+H] ⁺ | 15,49 | RP-LC-QTOF-MS | 0,32 | - | 3,64E-02 | 0,35 | 4,13 | 1,76E-02 | 1,11 | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|--------------|-----------|---|--|-------|-----------------------|-------|----------|---|------|----------|--------------|------|----------|--------------|
| Methylmalonylcarnitine | C ₁₁ H ₁₉ NO ₆ | 261,121 2 | 1,67 | 3 | [M+H] ⁺ | 7,36 | RP-LC- QTOF- MS | 0,50 | - | - | 0,51 | 1,3 4 | 3,08E -02 | 1,02 | - | - |
| Hexadecenylcarnitine | C ₂₃ H ₄₃ NO ₄ | 397,319 2 | 22,0 1 | 5 | [M+H] ⁺ | 13,18 | RP-LC- QTOF- MS | 15,88 | 1,3 0 | - | 1,57 | - | - | 0,10 | 1,4 8 | 4,90E -02 |
| Octadecenylcarnitine | C ₂₅ H ₄₇ NO ₄ | 425,350 5 | 22,9 9 | 5 | [M+H] ⁺ | 3,20 | RP-LC- QTOF- MS | 10,23 | 1,8 7 | - | 0,93 | - | - | 0,09 | 2,2 0 | 4,90E -02 |
| Decanoylcarnitine | C ₁₇ H ₃₃ NO ₄ | 315,241 | 16,9 9 | 1 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 9,14 | RP-LC- QTOF- MS | 1,00 | - | - | 9,36 | - | 3,08E -02 | 0,11 | 1,2 3 | |
| Benzenoids | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyramine | C ₈ H ₁₁ NO | 137,084 1 | 3,2 | 2 | [[M-H]-H ₂ O]- | 4,34 | RP-LC- QTOF- MS | 0,69 | 3,3 0 | - | 0,82 | 2,8 6 | | 0,84 | 2,7 9 | |
| Carbohydrate phosphate | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ribose cyclic phosphate phosphate | C ₅ H ₁₀ O ₁₀ P ₂ | 291,974 9 | 1,03 | 6 | [[M-H]-H ₂ O]- | 11,73 | RP-LC- QTOF- MS | 0,93 | - | - | 1,14 | - | | 0,82 | 1,3 8 | 2,80E -02 |
| Carbohydrates and carbohydrate conjugates | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenethylamine glucuronide | C ₁₄ H ₁₉ NO ₆ | 297,121 2 | 1,77 | 2 | [[M- H] ⁺ +CH ₃ COONa]- | 10,43 | RP-LC- QTOF- MS | 0,28 | 1,4 7 | - | 0,34 | - | | 0,84 | - | |
| Amino-phosphoribosylamino uracil | C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₉ P | 354,057 7 | 16,5 7 | 5 | [M-H]- | 1,53 | RP-LC- QTOF- MS | 1,00 | 2,9 9 | - | 1,09 | 3,4 1 | | 0,91 | 3,8 5 | |
| Nucleosides, nucleotides, and analogues | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Adenosine diphosphate ribose | C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₄ P ₂ | 559,071 7 | 1,64 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 7,12 | RP-LC- QTOF- MS | 0,49 | - | - | 1,07 | - | | 0,46 | 1,2 8 | |
| UDP-alpha-D-galactose | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂ | 566,055 | 1,48 | 2 | [M-H]- | 4,13 | RP-LC- QTOF- MS | 0,58 | - | - | 1,32 | - | | 0,44 | 1,3 5 | 4,90E -02 |
| UDP-glucose | C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂ | 566,055 | 1,48 | 2 | [M-H]- | 4,13 | RP-LC- QTOF- MS | 0,58 | - | - | 1,32 | - | | 0,44 | 1,3 5 | 4,90E -02 |
| Uridine diphosphate-N-acetylgalactosamine | C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂ | 607,081 6 | 1,5 | 2 | [M-H]- | 2,28 | RP-LC- QTOF- MS | 0,62 | 2,5 6 | - | 1,12 | 1,9 3 | | 0,55 | 3,9 1 | |
| Phenols | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Folic acid | C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆ | 441,139 7 | 14,7 3 | 2 | [M-H]- | 2,36 | RP-LC- QTOF- MS | 2,27 | - | - | 1,33 | - | | 1,71 | 1,0 8 | 4,90E -02 |

| Phenylpropanoids and polyketides | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----------|------|---|---------------------------|------|---------------|------|------|---|------|------|--|------|------|--|
| Phenyllactic acid | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 166,063 | 3,19 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 3,95 | RP-LC-QTOF-MS | 0,85 | 1,39 | - | 1,00 | 1,25 | | 0,84 | 1,63 | |
| Desaminotyrosine | C ₉ H ₁₀ O ₃ | 166,063 | 3,19 | 1 | [[M-H]-H ₂ O]- | 3,95 | RP-LC-QTOF-MS | 0,85 | 1,39 | - | 1,00 | 1,25 | | 0,84 | 1,63 | |
| Prenol Lipids | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Farnesyl triphosphate | C ₁₅ H ₂₈ O ₁₀ P ₃ | 462,0974 | 6,97 | 2 | [M-H]- | 5,97 | RP-LC-QTOF-MS | 0,89 | - | - | 1,09 | - | | 0,82 | 1,06 | |
| ^a CV, coefficient of variation in the metabolites in the QC samples; ^b Change, percent change in the abundance of the specified comparison calculated as (case-control)/control * 100, where the sign indicates the direction of change in the case group; ^c VIP, variable importance in projection; ^d p value * corresponding to the p values calculated by the Benjamini-Hochberg false discovery rate post hoc correction (FDR < 0.05). GM: global metabolomics, GL: Global lipidomics, HILIC: hydrophilic interaction chromatography, LC: liquid chromatography, QTOF-MS: quadrupole time-of-flight mass spectrometer. | | | | | | | | | | | | | | | | |

Metabolitos que se alteraron cuando la línea SW620 se trató con los SCAFs 11 y 13, (Compound; Fórmula; Mass; RT (min) tiempo de retención; Mass Error (ppm) error de masa; Adduct; CV for QC (%) coeficiente de variación de los metabolitos en las muestras de control de calidad (QC); Analytical platform plataforma analítica (HILIC-LC-QTOF-MS; RP-LC-QTOF-MS) DET: método de determinación; Fuente de ionización por electrospray ESI (+/-). Y para cada comparación realizada: (SW620 SCAF 11 VS SW620 Medio + DMSO); (SW620 SCAF 13 VS SW620 Medio + DMSO); (SW620 SCAF 13 VS SW620 SCAF 13); b Fold Change: cambio porcentual en la abundancia de la comparación especificada calculada como (caso-control)/control * 100, donde el signo indica la dirección del cambio en el grupo de casos; ^cVIP, importancia variable en la proyección; d valor de p * correspondiente a los valores de p calculados mediante la corrección post hoc de la tasa de descubrimiento falso de Benjamini-Hochberg (FDR ≤ 0.05). los valores de Fold change mayor a 1 indican que los metabolitos se están sobre expresando para cada una de las comparaciones realizadas.

7.7 Controles de calidad y pretratamiento en los análisis metabolómicos de células SW620 expuestas a las SCAF 11 y 13

La reproducibilidad de las plataforma analíticas se ven reflejada en el agrupamiento consistente entre los QC (Figura 21 a-c para UHPLC-HILIC (-) y Figura 21 d-f para RP-LC/ -QTOF-MS (-). En todos los análisis, los controles de calidad están separados y agrupados demostrando reproducibilidad en el análisis en diferentes momentos. A partir de esto se continuó trabajando con los datos de HILIC, en donde se llevó a cabo el pretratamiento de los datos sin QC. Todos los análisis se realizaron para los tres grupos de células, a saber: G6: células SW620 no tratadas; G7: células SW620 tratadas con SCAF 11; y G8: células SW620 tratadas con SCAF 13.

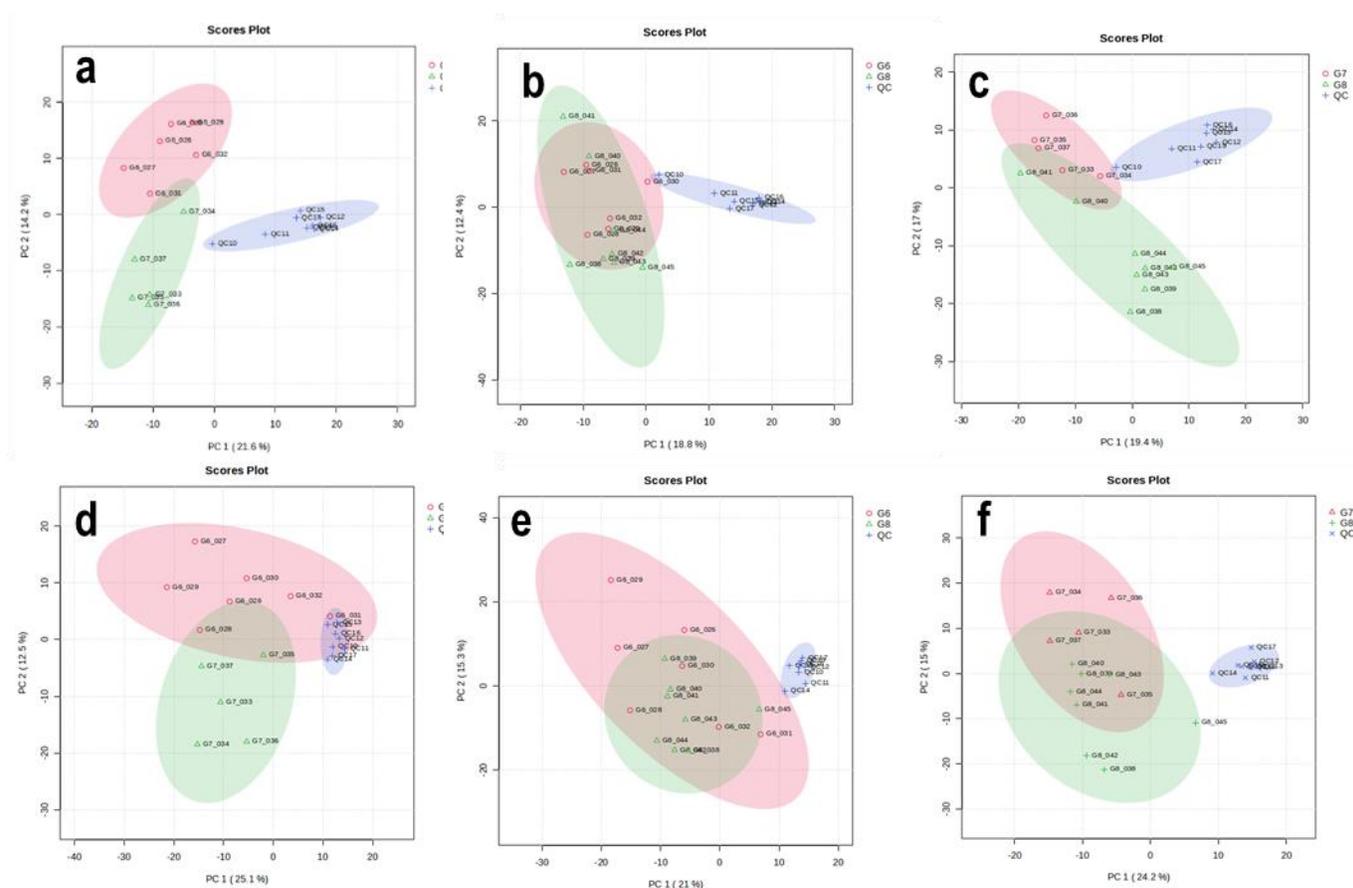
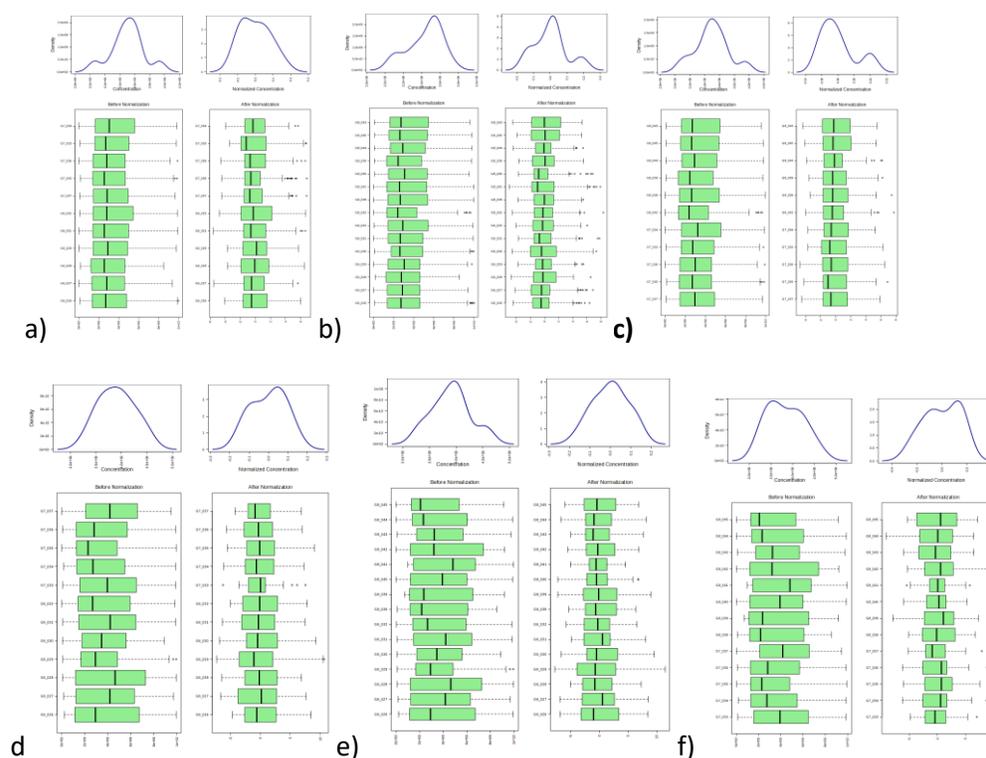


Figura 21. Análisis de componentes principales para la comparación entre grupos. a) G6 vs G7 y QC en UHPLC-HILIC (-); b) G6 vs G8 y QC en UHPLC-HILIC (-); c) G7 vs G8 y QC UHPLC-HILIC (-); d) G6 vs G7 y QC RP-LC/ -QTOF-MS (-); e) G6 vs G8 y QC RP-LC/ -QTOF-MS (-); f) G7 vs G8 y QC RP-LC/ -QTOF-MS (-).

7.7 Pretratamiento UHPLC-HILIC (-), UHPLC- RP-ESI (-) y UHPLC- RP-ESI (+)

A partir del pretratamiento de los datos se evaluó la uniformidad en los datos después de la normalización mediante el análisis de cajas y bigotes. Como se observa en la Figura 22, para todos los estudios se representa el antes y después de la normalización. La comparación entre los grupos G6 y G7 realizada con la plataforma UHPLC-HILIC (-) muestra una centralización entre las muestras (Figura 22a). Este mismo comportamiento se puede observar en el pretratamiento de los datos para la comparación entre G6 y G8 (Figura 22b) y para la comparación entre G7 y G8 (Figura 22c). En el caso de UHPLC- RP-ESI (-) y UHPLC- RP-ESI (+) se puede evidenciar el mismo comportamiento en todas las comparaciones (Figura 22d-i), de la siguiente manera; comparación en la plataforma UHPLC- RP-ESI (-) de G6 y G7 (Figura 22d), G6 y G8 (Figura 22e) y G7 y G8 (Figura 22f), así como comparación en la plataforma UHPLC- RP-ESI (+) de G6 y G7 (Figura 22g), G6 y G8 (Figura 22h) y G7 y G8 (Figura 22i).



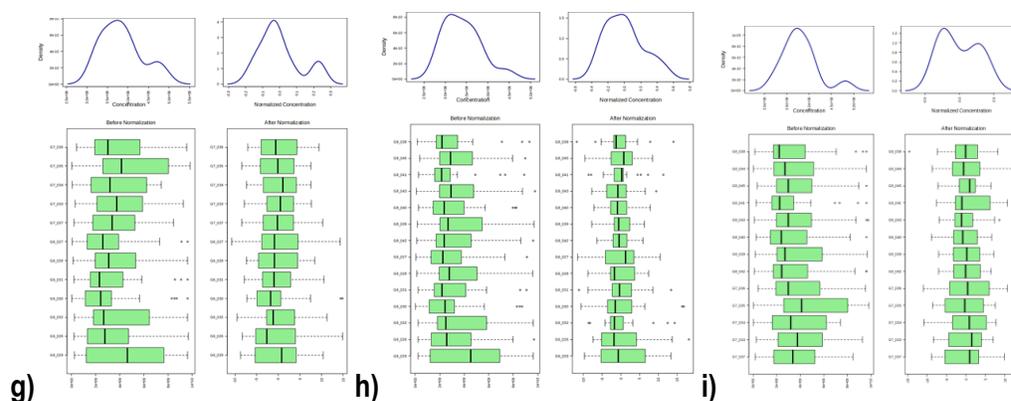


Figura 22. Pretratamiento de los datos - diagrama de cajas y bigotes. a) UHPLC-HILIC (-) comparación entre G6 y G7 para la línea celular SW620 y SCAF11; b) UHPLC-HILIC (-) comparación entre G6 y G8 para la línea celular SW620 y SCAF13; c) UHPLC-HILIC (-) G7 y G8 realizada para la línea celular SW620 con los compuestos SCAF11 y SCAF13; d) UHPLC- RP-ESI (-) G6 y G7; e) UHPLC- RP-ESI (-) G6 y G8. f) UHPLC- RP-ESI (-) G7 y G8; g) UHPLC- RP-ESI (+) G6 y G7; h) UHPLC- RP-ESI (+) G6 y G8; i) UHPLC- RP-ESI (+) G7 y G8.

7.8 Análisis multivariado de los grupos del ensayo

Una vez lograda la normalización y el escalado de Pareto se realizó el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales (OPLS-DA) para las diferentes comparaciones entre grupos.

7.8.1 OPLS-DA de UHPLC-HILIC (-) para la comparación entre células SW620 no tratadas (G6) y las células SW620 tratadas con la SCAF 11 (G7)

El Score plot del OPLS-DA para G6 vs G7 muestra un valor para la componente T score [1] de 22% (Figura 23a); este dato corresponde a la variación entre las clases en donde el componente ortogonal T [1] explica un 12,4% de la variación dentro de cada grupo de comparación; en total el gráfico explica la variación del 34,4% del total de los datos. Se observa que hay una dispersión similar de ambos grupos en cuanto a la componente ortogonal; sin embargo para el grupo del tratamiento G7 (color

verde), se observa que tiene una mayor área de dispersión comparado con el grupo control G6 (en color rojo); esto podría sugerir que las células al tener el compuesto SCAF11 podrían generar varios tipos de respuestas de manera aleatoria que lleven a aumentar la diferencia entre muestras del mismo grupo, sin embargo estas no son tan grandes como para no dejarse agrupar y generar distancia del control; adicionalmente, aunque la puntuación es relativamente baja se debe tener en cuenta que los ensayos fueron realizados en muestras biológicas, que responden a factores de estrés metabólico e incluso, debido a la misma naturaleza de las células ya que son originarias de un tejido tumoral de colon transformado, afectándose su metabolismo.

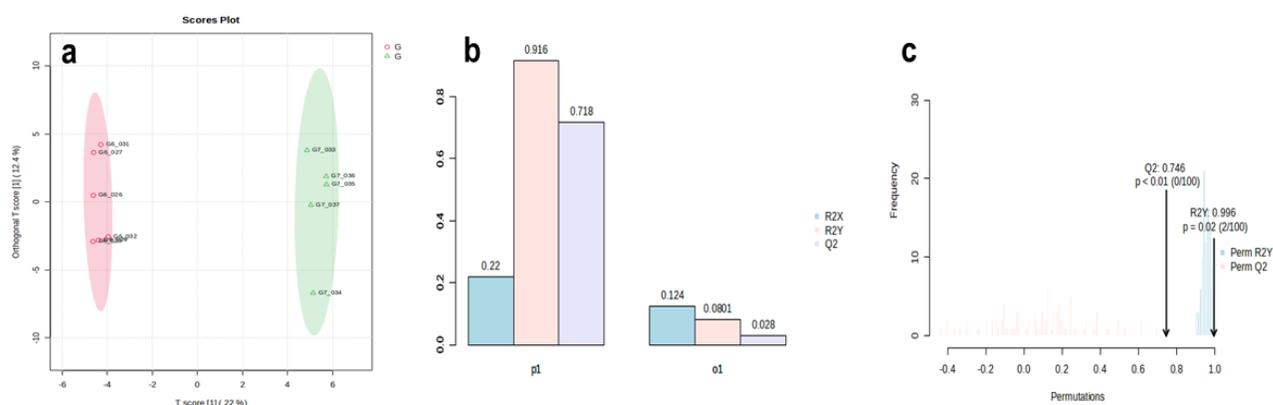


Figura 23. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabólico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G7 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

Adicionalmente, a partir de la validación cruzada del modelo, el R2Y y el R2X dan información acerca de la varianza de los datos respuesta y de los predictores respectivamente, en donde también se espera que una buena medición esté cerca de 1 (Figura 23b). Estos valores no deben ser negativos ya que no se consideraría un modelo apto para clasificación y que aporte información adecuada para su correcta validación, para este caso se puede ver como la varianza respuesta de los datos (R2Y=0,916) se ve explicada por el modelo al obtener un valor cercano a 1, así como la capacidad predictiva del modelo (Q2=0,718) siendo esta mayor a 0,5, dando solidez estadística al resultado.

El análisis de permutaciones (Figura 23c) se hizo con 100 permutaciones, los valores de p empíricos para Q2: $p < 0,01$ (0/100). En este tipo de análisis se espera que la clasificación entre los grupos se

realice de manera significativa, y para la validar el análisis de permutaciones los valores tanto de R2Y y Q2 deben ser mayores que los valores de p, generando un modelo bien clasificado, en este modelo se logra ver Q2=0,746 y un R2Y=0,996, en donde se puede decir que el modelo tiene la capacidad de clasificar correctamente entre las clases.

A partir del OPLS-DA se obtuvo el gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score (Variable Importance in Projection) con relación a la componente p1 (Figura 24). Para este modelo el software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos con un valor mayor a 1,3 (Thévenot et al., 2015). Al comparar el grupo G7 (células SW620 expuestas a la SCAF 11 en comparación al grupo G6 (células no tratadas), se identificaron 8 metabolitos diferentes en el G7 respecto al G6, y se listan en la Figura 16b.

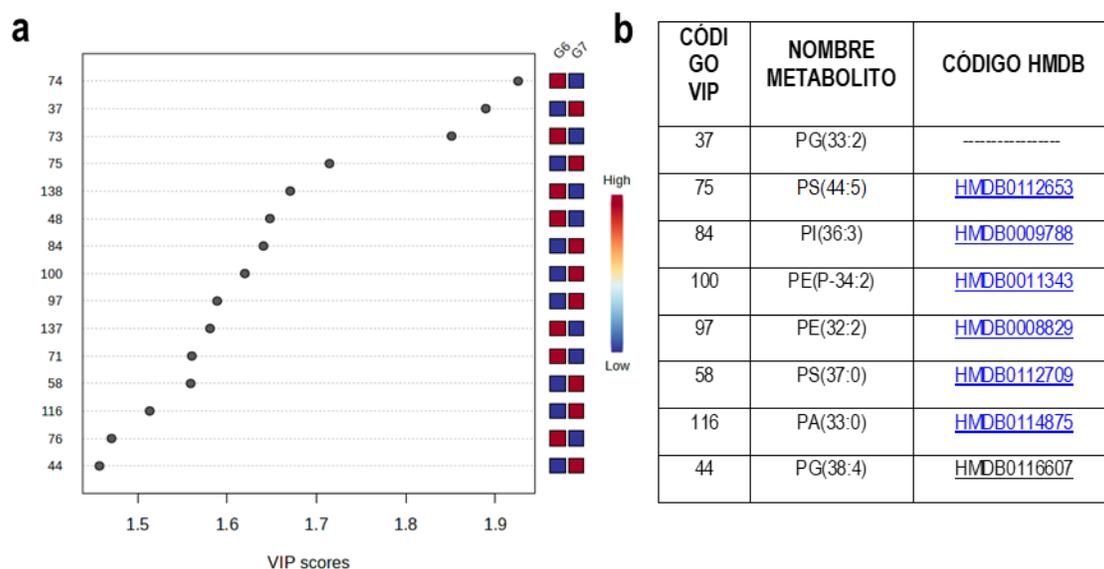


Figura 24. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G7 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G6 y G7 con la plataforma UHPLC-HILIC (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.2 OPLS-DA de UHPLC-HILIC (-) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF13 (G8)

El Score Plot del OPLS-DA para G6 con respecto a G8 (Figura 25a), se observa un 9,5% de los datos como resultado para la componente T score [1] y un 17,7% de la variación de los datos para la componente ortogonal T [1]; en total se observa una variación del 27,2% de los datos y que hay una mayor dispersión de las muestras en el G8 (color verde), mientras que en el G6 (color rojo) hay una menor dispersión.

La validación cruzada del modelo (Figura 25b) muestra que los valores para $R^2Y=0,794$, $R^2X=0,0946$ $Q^2=0,16$, si bien todo son valores positivos, el Q^2 obtenido sugiere que la capacidad predictiva del modelo es baja; sin embargo, el R^2Y tiene un valor aceptable que permite encontrar variables respuesta de clasificación. Así mismo el análisis de permutaciones permitió discriminar entre las variables, aunque con un valor de significancia bajo ($Q^2=0,374$) (Figura 25c).

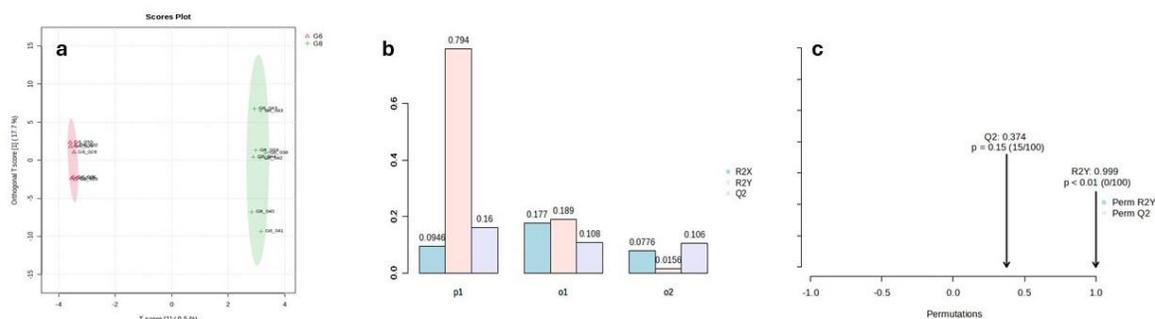


Figura 25. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

Para la generación del listado de metabolitos se obtuvieron a partir del gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score (Variable Importance in Projection) con relación a la componente p1, el software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,4 (Thévenot et al., 2015), tanto en el G6 como en el G8 como metabolitos diferenciales entre las células SW620 no tratadas (G6) y las células SW620 tratadas con la SCAF13 (G8) (Figura 26a). Los 7 metabolitos a tener en cuenta como metabolitos diferenciales en el G8 respecto al G6 se muestran en

la Figura 26b y corresponden a los metabolitos que aparecen en rojo en la Figura 26a para el grupo G8 ya que son los metabolitos que aparecen cuando se han tratado las células con la SCAF 13.

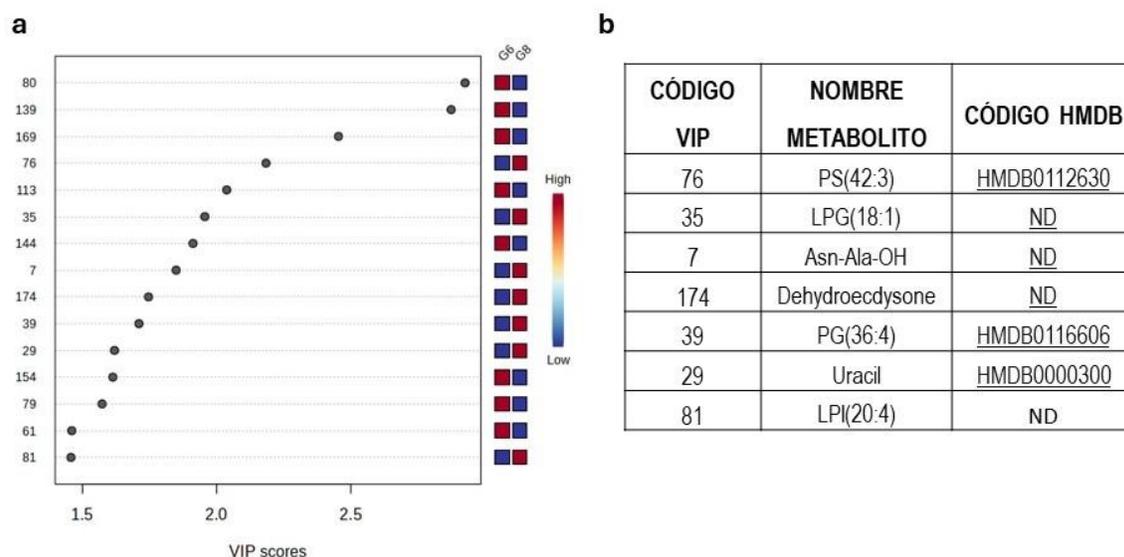


Figura 26. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G8 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G6 y G8 con la plataforma UHPLC-HILIC (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G8 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.3 OPLS-DA de UHPLC-HILIC (-) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8).

Con el fin de observar la presencia de metabolitos diferentes al tratar las células SW20 con SCAF 11 o SCAF 13, el Score Plot del análisis OPLS-DA para G7 con G8 (Figura 27a) muestra un valor para la componente T score [1] de 30,5% que corresponde a la variación entre las clases y explica la variación de los datos dentro de cada grupo de comparación; por otro lado, la componente ortogonal T [1] explica un 8,3% de la variación dentro de cada grupo de comparación G7 o G8. En total se observa una variación del 38,8% del total de los datos, con una mayor dispersión en el eje Y de las muestras que están en el grupo G7 (en rojo) que corresponden a las células SW620 tratadas con SCAF 11, mientras que las muestras del grupo G8 (en verde) muestran un mayor agrupamiento en el eje Y pero un poco más dispersas para el eje X, sugiriendo que tal vez la respuesta por parte de las células a los diferentes compuestos no es similar

y que podrían haber diferencias en los metabolitos encontrados con respecto a los análisis anteriores en donde se compararon células expuestas a cada uno de los dos SCAF con las células no expuestas.

Por su parte, la validación cruzada del modelo, indica que los valores obtenidos para la validación del método, $R^2Y=0,969$, $R^2X=0,305$ $Q^2=0,87$ en la componente prueba de permutación (p_1), para esta comparación el modelo clasifica de manera adecuada ya que el valor de Q^2 obtuvo un puntaje mayor a 0,5, y el valor de R^2Y está cercano a 1 corroborando que este modelo tiene una buena capacidad predictiva en la clasificación de grupos (Figura 27b).

Adicionalmente, el Análisis de permutaciones con 100 permutaciones arrojó valores de p empíricos para Q^2 de $p < 0,01$ (0/100) y R^2Y : $p = 0,01$ (0/100), siendo $Q^2=0,873$ y $R^2Y=0,998$ (Figura 27c). Se espera que para la validación del análisis de permutaciones los valores tanto de R^2Y y Q^2 deben ser mayores que los valores de p , generando un modelo bien clasificado lo cual se observa en este resultado.

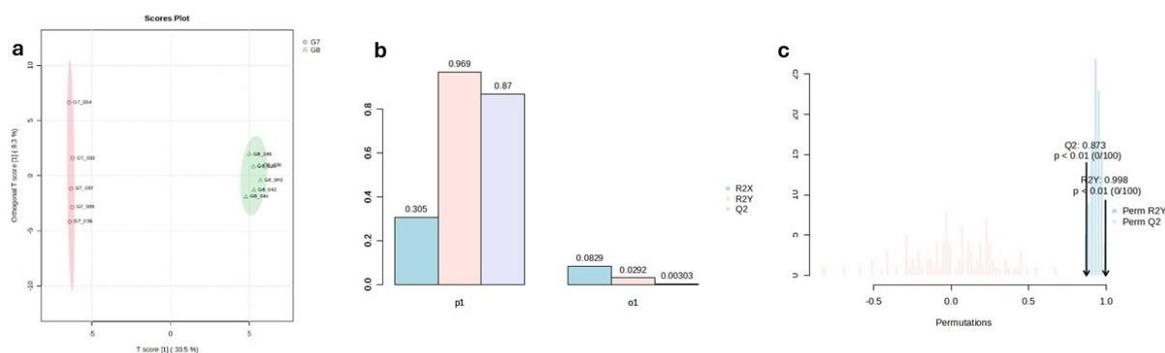


Figura 27. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-HILIC (-). a) Score plot OPLS-DA: G7 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p_1) y componente de valores atípicos outliers (o_1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

A partir del OPLS-DA se obtuvo el gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score (Variable Importance in Projection) (Figura 28a), con relación a la componente p_1 , para este modelo el software Metaboanalyst sugiere los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,53, (Thévenot et al., 2015) como diferenciales entre las dos condiciones del ensayo; grupo G7: células SW620 pasadas 8 h después de la inducción de SCAF 11 y grupo G8: células SW620 pasadas 8 h

después de la inducción de SCAF13, En el caso de esta comparación los metabolitos a tener en cuenta son los que aparecen en rojo para cada uno de los grupos (G7 y G8) y que se muestran en Tablas separadas (Figura 28b), indicando que están en una mejor clasificación, dado que aquí lo que interesa es saber los metabolitos diferenciales que se manifiestan cuando se han tratado a las células con SCAF 11 y SCAF 13, para verificar si hay diferencias entre los listados de metabolitos que puede ser atribuida a la porción meta o para CF₃ ya que es la única diferencia entre los dos compuestos.

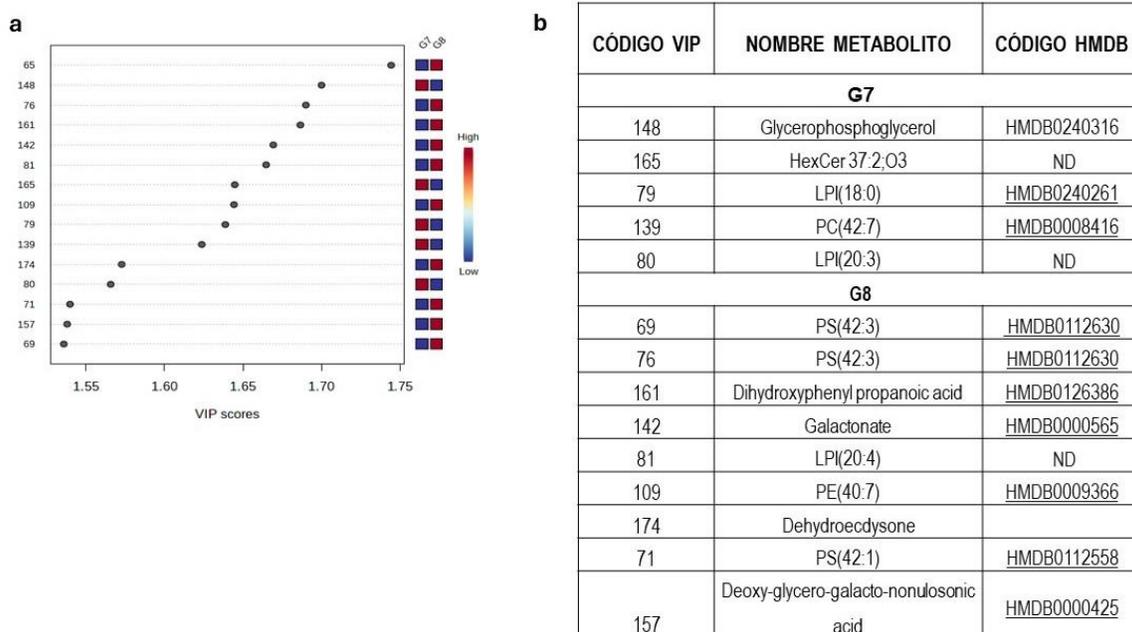


Figura 28. Importancia relativa de metabolitos en la discriminación de grupos G7 vs G8. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G7 y G8 con la plataforma UHPLC-HILIC (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G8 con sus códigos HMDB.

7.8.4 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (-) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 11 (G7)

En el resultado presentado en el Score plot OPLS-DA, para la comparación entre G6 con G7 con UHPLC-RP-ESI (-) explica la distribución de los datos y la separación de los grupos de dicha comparación, en donde la componente T score [1] corresponde a la variación entre las clases y explica el 15.4% de los datos, mientras que la componente ortogonal T [1] explica un 9.6% de la variación

dentro de cada grupo G6 o G7, explicando el 25% de la variación total de los datos (Figura 29a). Sin embargo, en el grupo G7 (color verde), se nota una mayor área de dispersión en comparación con el grupo control en color rojo, donde la dispersión es menor. Esto podría sugerir que las células tratadas con SCAF 11 podrían generar varios tipos de respuestas de manera aleatoria, lo que aumentaría la diferencia entre muestras del mismo grupo. No obstante, estas diferencias no son lo suficientemente grandes como para evitar la agrupación y generar distancia del control (G6). Este resultado es similar al observado en los análisis HILIC (-).

El modelo OPLS-DA al igual que para los análisis HILIC fueron validados por medio de una validación cruzada o Model Overview con valores $R^2Y=0,934$, $R^2X=0,154$ $Q^2=0,59$ para la componente principal 1 (p1). En este caso la validación permitió verificar que el modelo clasifica bien teniendo el mayor peso en la componente prueba de permutación (p1) más que en la de valores atípicos (σ_1) (Figura 29b). Para la comparación entre G6 y G7 se obtuvieron valores de p empíricos para Q^2 : $p=0,01$ (1/100) y R^2Y : $p=0,01$ (1/100), siendo $Q^2=0,634$ y $R^2Y=0,989$ (Fig 29c). Según el análisis de permutaciones, los valores tanto de R^2Y y Q^2 fueron mayores que los valores de p, sugiriendo un modelo bien clasificado.

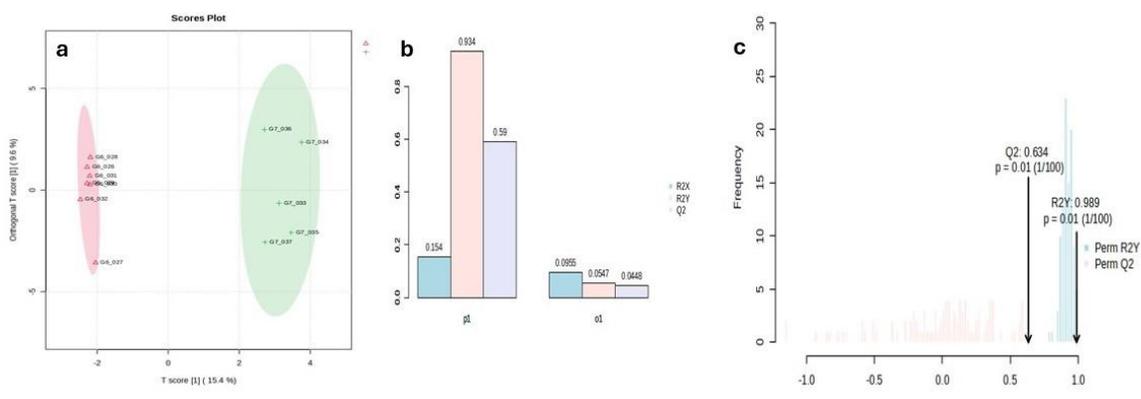


Figura 29. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabólico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G7 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (σ_1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

Para la generación del listado de metabolitos se obtuvieron a partir del gráfico de Importancia Variable en la proyección VIP's score con relación a p1. El software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,22 (Thévenot et al., 2015) (Figura 30a). Para el caso de

la comparación de G7 vs G6, fueron 8 los metabolitos diferentes en G7 y se muestran en la Figura 30b.

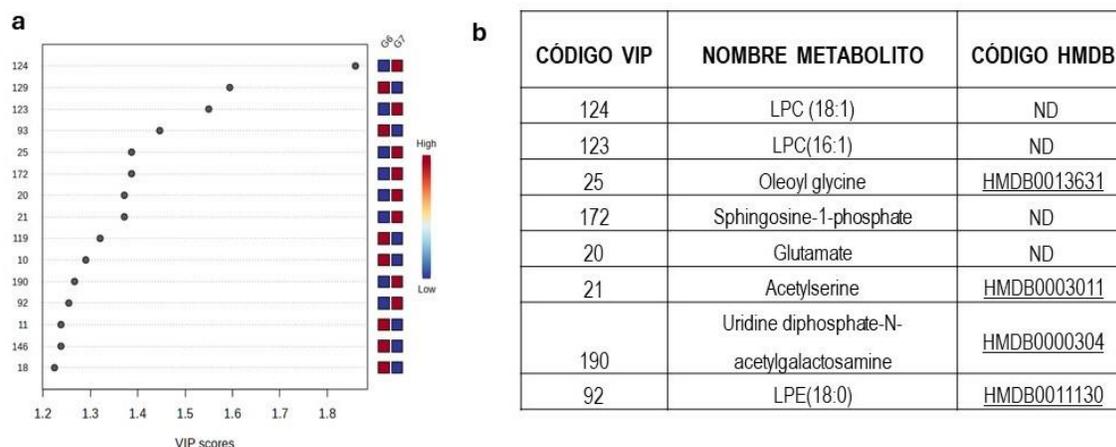


Figura 30. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G7 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G7 y G6 con la plataforma UHPLC-RP - ESI (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.5 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (-) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 13 (G8)

La componente T score [1] corresponde a la variación entre las clases y explica el 9.9% de los datos y la componente ortogonal T [1] explica un 18,1% de la variación dentro de cada grupo de comparación G6 o G8 (Figura 31a). En total se muestra una variación del 28% del total de los datos con una mayor dispersión de las muestras en G6 (color rojo), mientras en el G8 (color verde), la dispersión es menor. Adicionalmente a partir del modelo de validación cruzada se obtuvieron los siguientes datos: $R^2Y=0,688$, $R^2X=0,0991$ $Q^2=0,286$ en la componente prueba de permutación (p_1) (Figura 31b). Aunque el valor de Q^2 obtuvo un puntaje bajo y el valor de $R^2Y=0,5$ no está cercano a 1, al no obtener valores negativos se considera que clasifica para avanzar en la búsqueda de más información que debe ser tenida en cuenta bajo los parámetros anteriormente descritos.

Con relación al análisis de permutaciones este se hizo con 100 permutaciones y se obtuvieron los siguientes valores de p empíricos para Q^2 : $p=0,11$ (11/100) y R^2Y : $p=0,03$ (3/100), siendo $Q^2=0,467$

y $R^2Y=0,995$ (Figura 31c); se espera que para la validación del análisis de permutaciones los valores tanto de R^2Y y Q^2 deben ser mayores que los valores de p , generando un modelo bien clasificado.

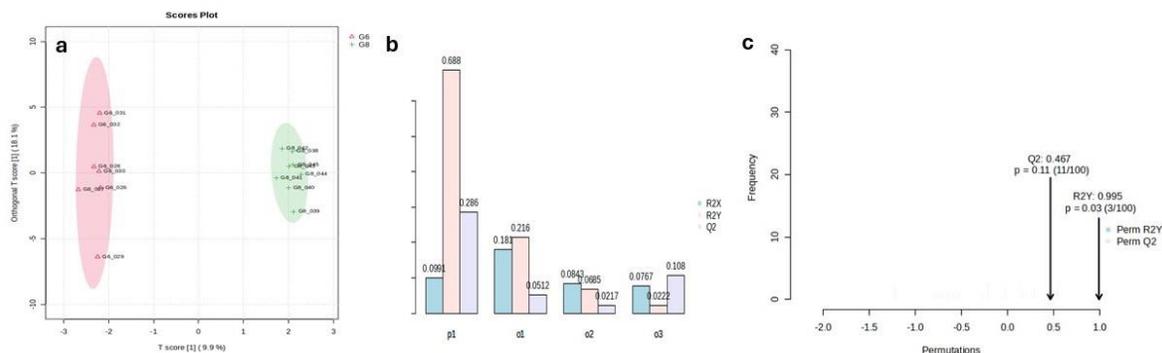


Figura 31. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabólico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

A partir del OPLS-DA se obtuvo el gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score para la generación del listado de metabolitos con relación a p1. Para este modelo el software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,14, (Thévenot et al., 2015) como diferenciales entre las células SW620 no tratadas (G6) y células SW620 tratadas con SCAF 13 (G8) (Figura 32a). En el caso de esta comparación los metabolitos que presentan una clasificación para G8 son 6 metabolitos que se muestran en la Figura 32b.

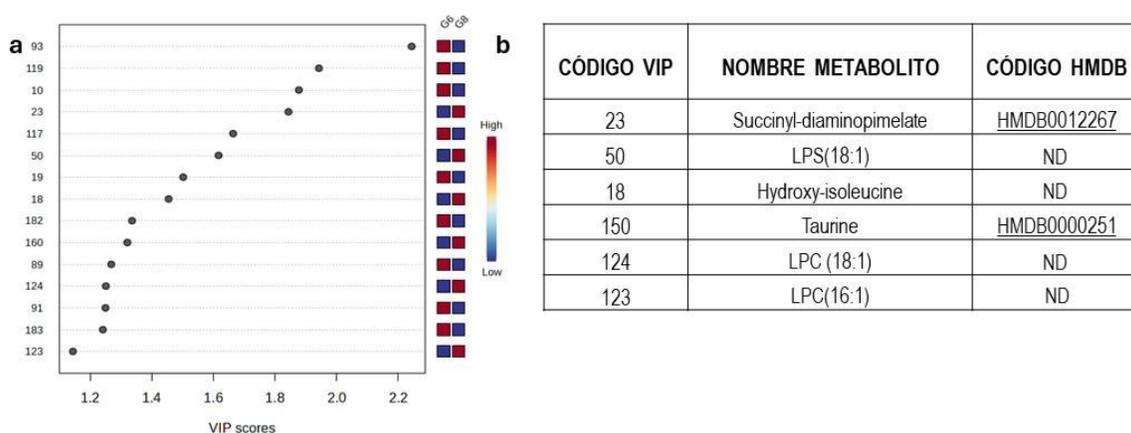


Figura 32. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G8 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G8 y G6 con la plataforma UHPLC-

RP - ESI (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HDMB.

7.8.6 OPLS-DA de UHPLC- RP-ESI (-) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8).

El Score plot OPLS DA explica la distribución de los datos y la separación de los grupos G7 (rojo) y G8 (verde) (Figura 33a). La componente T score [1] explica el 15,1% de la variación de los datos y la componente ortogonal T [1] explica un 14,4% de la variación dentro de cada grupo de comparación G7 o G8. El gráfico explica la variación del 29,5% del total de los datos, con una mayor dispersión en el eje Y de las muestras que están en el grupo G8 (en verde), mientras que las muestras del grupo G7 (en rojo) muestran un amplitud del grupo células tratadas con SCAF 13 en el eje Y, un poco menos dispersa. Con relación al eje X la dispersión es muy pequeña haciendo que las muestras se distribuyan de una manera más homogénea, lo que sugiere una respuesta similar de las células a los diferentes compuestos.

A partir del modelo de validación del método, el análisis de validación cruzada arrojó los valores $R^2Y=0,888$, $R^2X=0,151$ $Q^2=0,602$ (Figura 33b). En la componente principal 1 (p_1) se presentan 3 grupos de histogramas; sin embargo, la componente prueba de permutación (p_1), para esta comparación el modelo clasifica de manera adecuada ya que el valor de Q^2 obtuvo un puntaje mayor a 0,5, y el valor de R^2Y está cercano a 1 corroborando que este modelo tiene una buena capacidad predictiva en la clasificación de grupos.

Por último y con relación al análisis de permutaciones este hizo con 100 permutaciones y se obtuvieron los siguientes datos, Valores de p empíricos para Q^2 : $p=0,01$ (1/100) y R^2Y : $p=0,01$ (1/100), siendo $Q^2=0,798$ y $R^2Y=0,997$ (Figura 33c). Toda vez que los valores R^2Y y Q^2 son mayores que los valores de p , el modelo se considera bien clasificado.

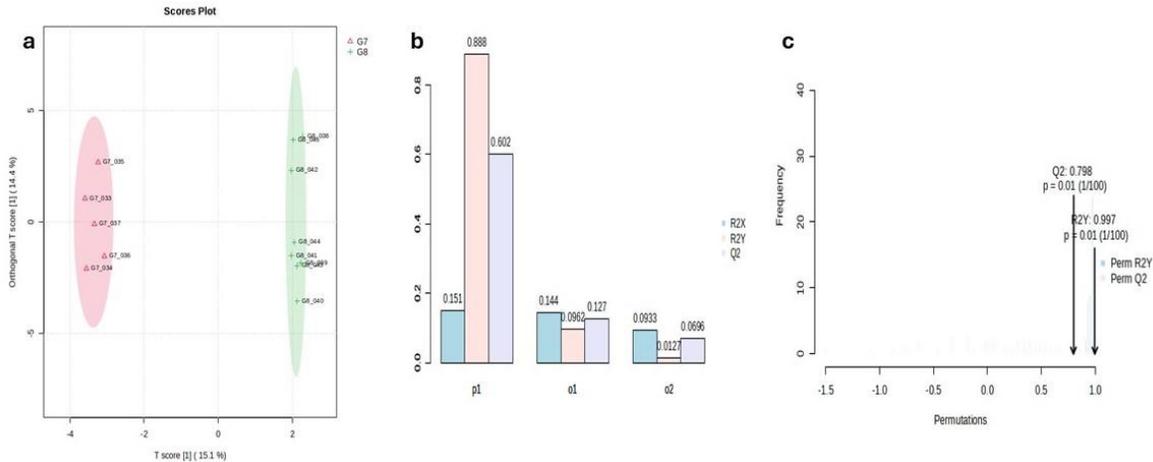


Figura 33. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (-). a) Score plot OPLS-DA: G7 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

El software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,14, (Thévenot et al., 2015) como diferenciales entre las células SW620 tratadas con SCAF 11 y las células SW620 tratadas con SCAF 13 (Figura 34a). En esta comparación se tomaron en cuenta los metabolitos que aparecen en rojo para ambos grupos. El listado de metabolitos se muestra en la Figura 34b. Se identifica como metabolito inducido en los dos grupos el LPE uno de 18 carbonos y saturado (18:0) en G7 y el otro de 20 carbonos y cuatro insaturaciones (20:4) en G8.

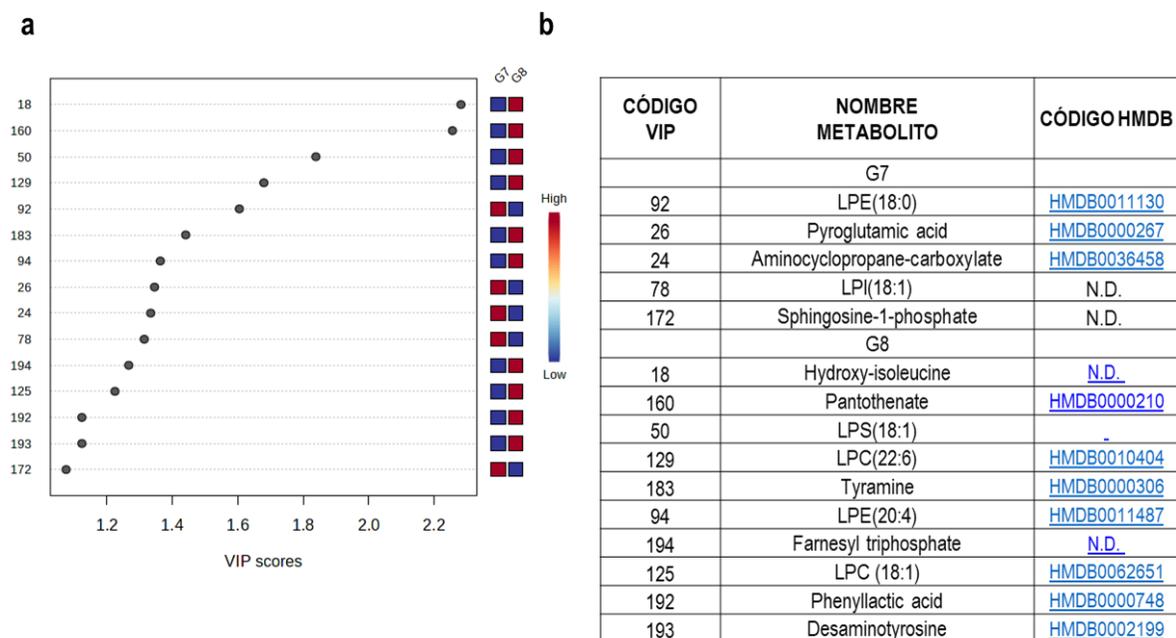


Figura 34. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G7 vs G8. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G7 y G8 con la plataforma UHPLC-RP - ESI (-); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.6 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 11 (G7)

Una vez lograda la normalización por suma se procedió a verificar el modelo con los análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales ortogonales OPLS-DA siendo este la mejor aproximación para verificar las diferencias entre metabolitos en esta clase de ensayos, ya que, ofrece una separación correcta de los grupos permitiendo observar y generar la clasificación de los metabolitos que marcan la diferencia entre ambas condiciones. En el gráfico de puntuaciones OPLS-DA la componente T score [1] que corresponde a la variación entre las clases explica el 22,2% de los datos y la componente ortogonal T [1] explica un 17,6% de la variación dentro de cada grupo de comparación G6 o G7 (Figura 35a). En total el gráfico explica la variación del 39,8% del total de los datos, con una mayor dispersión para el G6 (color rojo) en el eje Y que lo observado con el grupo G7

(color verde); ambos grupos se comportan de manera similar cuando se observa la dispersión a lo largo del eje X (Figura 35a).

Para la validación del método de validación cruzada se obtuvieron valores de $R2Y=0,896$, $R2X=0,222$, $Q2=0,726$ (Figura 35b) en la componente principal 1 ($p1$) lo que permitió verificar que el modelo clasifica bien teniendo el mayor peso en la componente prueba de permutación ($p1$) más que en la de valores atípicos ($\sigma1$).

Con relación al análisis de permutaciones realizado con 100 permutaciones arrojó valores empíricos para $Q2$ de $p=0,01$ (1/100) y $R2Y$: $p=0,01$ (1/100), siendo $Q2=0,795$ y $R2Y=0,996$ (Figura 35c). Según los valores $R2Y$ y $Q2$ fueron mayores a los valores p , se sugiere que el modelo esta bien clasificado.

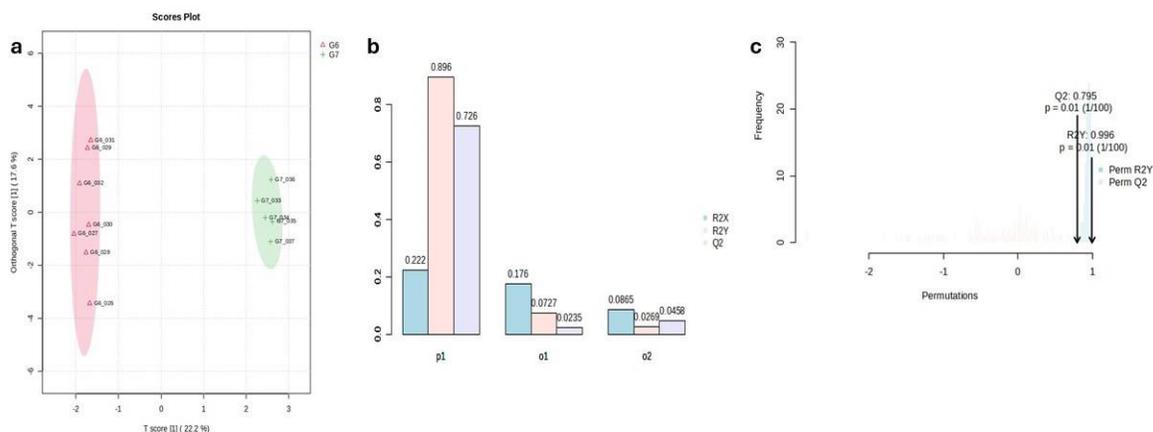


Figura 35. Diferencias entre G6 y G7 según el análisis metabólico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G7 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 ($p1$) y componente de valores atípicos outliers ($\sigma1$); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

Para la generación del listado de metabolitos se obtuvieron a partir del gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score (Variable Importance in Projection) con relación a $p1$, el software Metaboanalyst sugiere los 8 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,14. Aunque los metabolitos que excedan el valor de 1 en este tipo de proyección, pueden ser tenidos en cuenta como diferenciales entre las células SW620 no tratadas y las células SW620 tratadas con SCAF 11, se decidió trabajar con los 8 metabolitos mejor rankeados por el software Metaboanalyst (Thévenot et al., 2015) (Figura 36a). Los 5 metabolitos diferentes para el grupo G7 se listan en la Figura 36b.

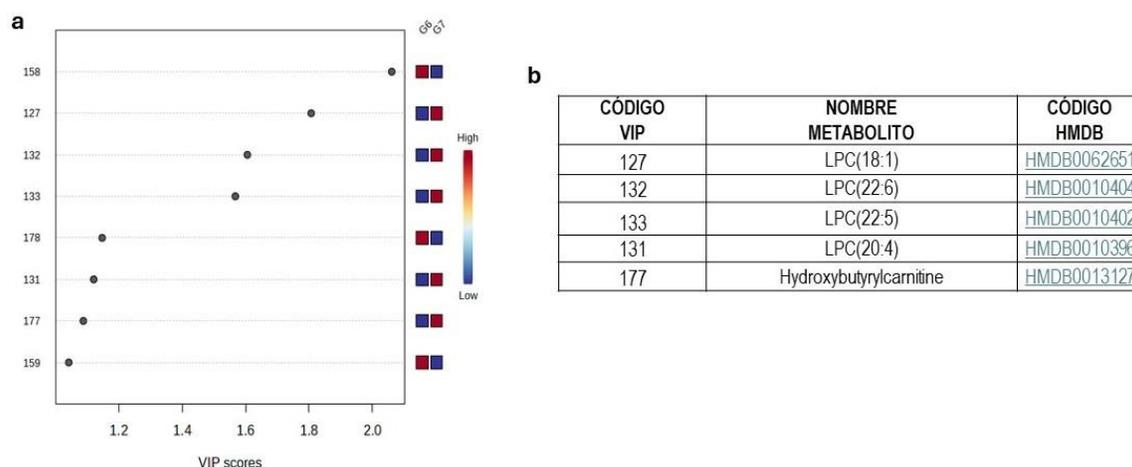


Figura 36. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G7 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G7 y G6 con la plataforma UHPLC-RP - ESI (+); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.7 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 (G6) y SW620 con SCAF 13 (G8)

La componente T score [1] que corresponde a la variación entre las clases explica el 13,5% en la variación de los datos y la componente ortogonal T [1] explica un 17,1% de la variación dentro de cada grupo de comparación G6 o G8 (Figura 37a). En total el gráfico explica la variación del 30,6% de los datos, observándose una mayor dispersión en ambos ejes tanto X como Y de las muestras G6, mientras que la dispersión es menor para las muestras del G8.

En la validación Cruzada se obtuvieron los siguientes datos: $R^2Y=0,73$, $R^2X=0,135$ $Q^2=0,257$ (Figura 37b). Aunque para la comparación entre G6 y G8 el modelo no clasifico bien debido a que el valor de Q^2 obtuvo un puntaje bajo, y el valor de R^2Y , aunque está por encima de 0.5 no está cercano a 1, al no obtener valores negativos se considera que clasifica para avanzar en la búsqueda de más información que debe ser tomada en cuenta bajo los parámetros anteriormente descritos.

En relación con el análisis de permutaciones este se realizó con 100 permutaciones y se obtuvieron los siguientes datos, valores de p empíricos para Q^2 : $p=0,06$ (6/100) y R^2Y : $p=0,02$ (2/100), siendo

Q2=0,321 y R2Y=0,863 (Figura 37c), se espera que para la validación del análisis de permutaciones los valores tanto de R2Y y Q2 deben ser mayores que los valores de p, generando un modelo bien clasificado tal cual como aplica en este caso.

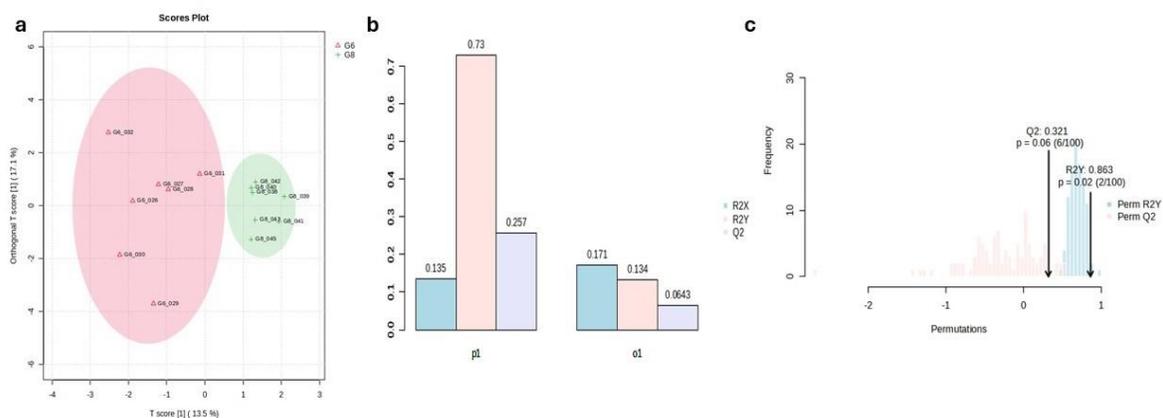


Figura 37. Diferencias entre G6 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+). a) Score plot OPLS-DA: G6 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

Para la generación del listado de metabolitos se obtuvieron a partir del gráfico de Importancia variable en la proyección VIP's score (Variable Importance in Projection) (Figura 38a), con relación a p1, para este modelo el software Metaboanalyst sugiere los 15 primeros metabolitos que están en un valor mayor a 1,3 (Thévenot et al., 2015) como diferenciales entre las células SW620 no tratadas y las células SW620 tratadas con SCAF 13. Se obtuvieron 7 metabolitos con valores de VIP's >1 y dentro de este grupo tan solo 3 metabolitos fueron destacados en el grupo G8 como diferenciadores (Figura 38b).

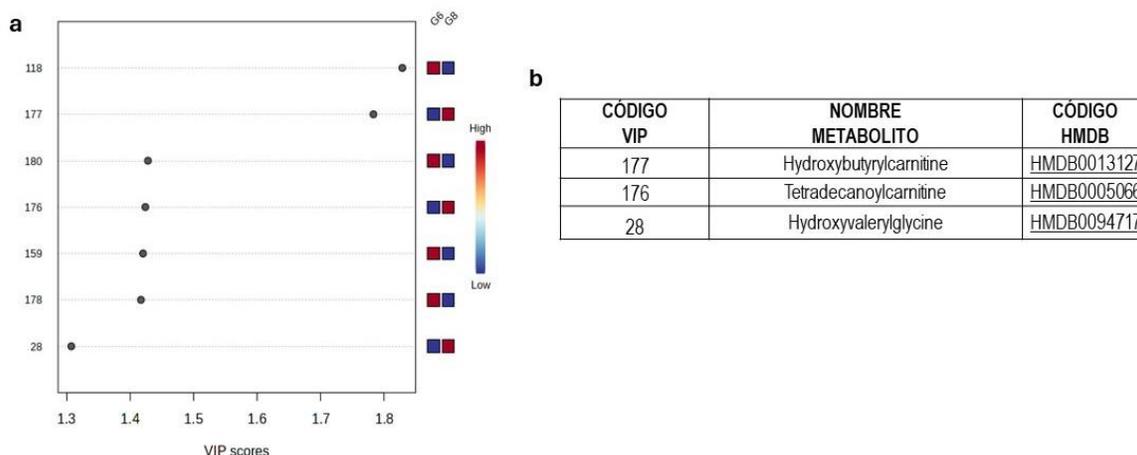


Figura 38. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G8 vs G6. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G8 y G6 con la plataforma UHPLC-RP - ESI (+); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.8.8 OPLS-DA de UHPLC-RP-ESI (+) para la comparación entre la línea celular SW620 con SCAF 11 (G7) y SW620 con SCAF 13 (G8)

El gráfico de puntuaciones OPLS DA explica la distribución de los datos y la separación de los grupos de comparación entre los grupos G7 (rojo) y G8 (verde) (Figura 39a). La componente T score [1] correspondiente a la variación entre las clases, explica el 33,1% de la variación de los datos entre grupos y la componente ortogonal T [1] explica un 14,4% de la variación dentro de cada grupo G7 o G8. Con esto, el gráfico explica la variación del 47,5% del total de los datos, con una mayor dispersión en el eje Y de las muestras que están en el grupo G8 (en verde) que corresponden a las células SW620 tratadas con SCAF 13, mientras que las muestras del grupo G7 (en rojo) muestran una menor área de dispersión tanto en el eje X como en el eje Y; la dispersión es muy pequeña haciendo que las muestras se distribuyan de una manera más homogénea sugiriendo que tal vez la respuesta por parte de las células a los diferentes compuestos es similar y que aunque podrían haber diferencias en los metabolitos encontrados no deberían tener puntuaciones tan diferenciales entre los grupos.

Los valores para la validación cruzada del método fueron $R^2Y=0,91$, $R^2X=0,331$ $Q^2=0,816$ (Figura 39b) en la componente principal 1 (p1) o de permutación 1. El modelo solo requirió de la generación

de dos grupos de histogramas siendo un resultado adecuado para este tipo de experimentos y la componente prueba de permutación (permutation test) “p1”, para esta comparación el modelo clasifica de manera adecuada ya que el valor de Q2 obtuvo un puntaje mayor a 0,5, y el valor de R2Y está cercano a 1 corroborando que este modelo tiene una buena capacidad predictiva en la clasificación de grupos.

Con relación al Análisis de permutaciones con 100 permutaciones se obtuvieron los siguientes datos: valores de p empíricos para Q2: $p < 0,01$ (0/100) y R2Y: $p < 0,01$ (0/100), siendo $Q2=0,895$ y $R2Y=0,97$ (Figura 31c). Toda vez que los valores tanto de R2Y y Q2 son mayores que los valores de p, se genera un modelo bien clasificado (Figura 39c).

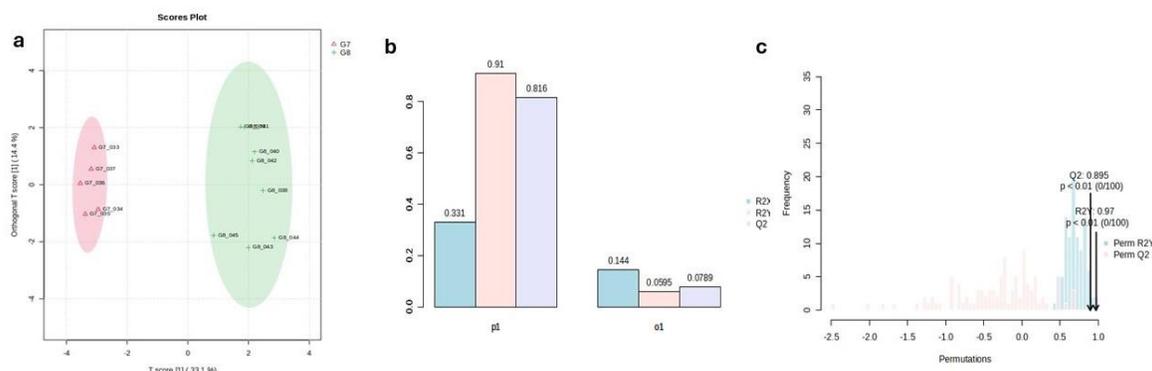


Figura 39. Diferencias entre G7 y G8 según el análisis metabolómico OPLS-DA con la plataforma UHPLC-RP- ESI (+). a) Score plot OPLS-DA: G7 (rojo) vs G8 (verde). B) Validación Cruzada del componente principal 1 (p1) y componente de valores atípicos outliers (o1); c) Análisis de permutación realizado con 100 permutaciones.

El software Metaboanalyst sugirió los 15 primeros metabolitos con un valor mayor a 1 (Thévenot et al., 2015) como diferenciales entre los grupos G7 y G8 (Figura 40a); sin embargo, para esta comparación el menor valor de VIP resultante aceptado fue 1,1 y solo 8 metabolitos clasificaron en total para la comparación entre ambos grupos; siendo solo 5 metabolitos destacados en el grupo G7 y 3 metabolitos para el G8 (Figura 40b).

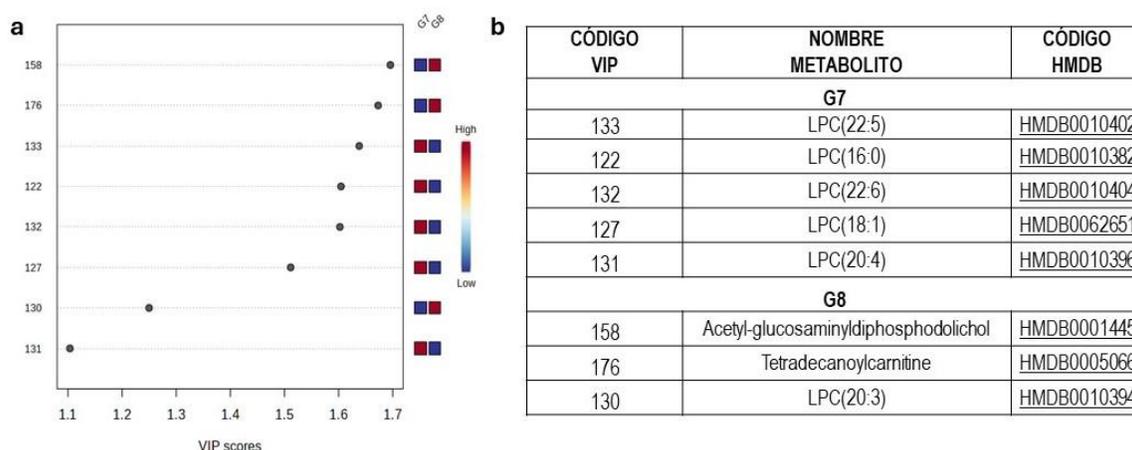


Figura 40. Importancia Relativa de Metabolitos en la Discriminación de Grupos G7 vs G8. a) Valores de importancia variable en la proyección (VIP) de la comparación G8 y G6 con la plataforma UHPLC-RP - ESI (+); b) Tabla de metabolitos clasificados de manera diferencial para el grupo G7 en comparación con los del grupo G6 con sus códigos HMDB.

7.9 Análisis de rutas metabólicas

7.9.1 Análisis de vías metabólicas.

El análisis de vías calcula la puntuación de impacto de la vía como la suma de las medidas de importancia de los metabolitos coincidentes, normalizados por la suma de las medidas de importancia de todos los metabolitos en cada vía. Sólo se consideraron vías enriquecidas con una puntuación de impacto $>0,01$. (Figura 41).

Con los códigos HMDB de los metabolitos diferenciales para G7 y analizados con el software Metaboanalyst, permitió identificar las siguientes vías:

- a. Metabolismo de amino azúcares y azúcares de nucleótidos
- b. Biosíntesis de valina, leucina e isoleucina
- c. Biosíntesis de pantotenato y CoA
- d. Metabolismo del glutatión
- e. Degradación de valina, leucina e isoleucina
- f. Biosíntesis de N-Glicanos
- g. Metabolismo de Tirosina

La importancia de estas vías se muestra en la Figura 33.

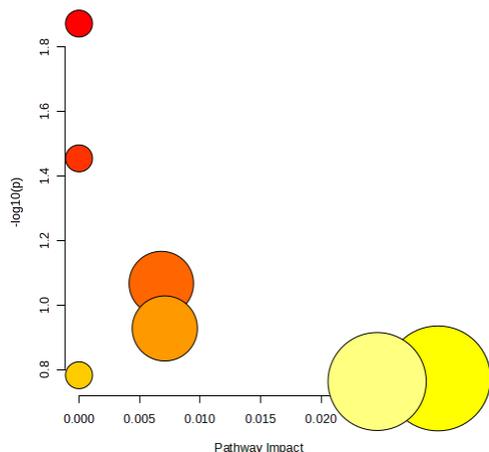


Figura 41. Impacto de las rutas de los metabolitos alterados en las vías metabólicas en células SW620 tratadas con SCAF 11 y detectados por metabolómica. Indica la importancia de las vías metabólicas relacionadas con los metabolitos obtenidos en las comparaciones, tanto por HILIC (-), RP-ESI (-) y RP-ESI (+) para G7 SCAF con código 11; relaciona el color, tamaño del radio de la circunferencia y la distancia del punto (0,0) del gráfico, asumiendo que la vía con mayor puntaje es la que se muestra en un círculo de color rojo de mayor diámetro, seguido del naranja y luego de los amarillos.

Los puntajes obtenidos en el análisis de vías metabólicas resultantes para SCAF 11 en células de CCR metastasica alojada en órgano anexo SW620, según análisis por las plataformas HILIC (-), RP-ESI (-) y RP-ESI (+) se resume en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de vías metabólicas asociadas al efecto de SCAF 11.

| Pathway Name | Match Status | p | -LOG(p) | Holm p | FDR | Impact | Details |
|---|--------------|----------|---------|--------|-----|---------|--|
| Metabolismo de azúcares amino y azúcares en nucleótidos | 2\42 | 0,013396 | 1,873 | 1 | 1 | 0 | KEGG , SMP |
| Biosíntesis de Valina, Leucina e Isoleucina | 1\8 | 0,035084 | 1,4549 | 1 | 1 | 0 | KEGG , SMP |
| Biosíntesis de Pantotenato y CoA | 1\20 | 0,085731 | 1,0669 | 1 | 1 | 0,0068 | KEGG , SMP |
| Metabolismo del Glutatión | 1\28 | 0,11821 | 0,92733 | 1 | 1 | 0,00709 | KEGG , SMP |

| | | | | | | | |
|---|------|---------|---------|---|---|---------|---------------------------|
| Degradación de Valina, Leucina e Isoleucina | 1\40 | 0,16508 | 0,7823 | 1 | 1 | 0 | KEGG, SMP |
| Biosíntesis de N-Glicanos | 1\41 | 0,16889 | 0,7724 | 1 | 1 | 0,02966 | KEGG |
| Metabolismo de Tirosina | 1\42 | 0,17268 | 0,76275 | 1 | 1 | 0,02463 | KEGG, SMP |

Datos tomados de la plataforma metaboanalyst 6.0. Se incluyen las rutas metabólicas ofrecidas por la plataforma y también las que poseen valor $p < 0,05$. Match Status (estado del emparejamiento); Indica la cantidad de metabolitos encontrados dentro del inventario de los mismos que coinciden con metabolitos intermediarios asignados a las vías bioquímicas. p; El valor p calculado para el análisis de la ruta metabólica refleja la probabilidad de obtener una diferencia igual o mayor que la observada cuando la hipótesis nula es cierta; - LOG(p) Un valor $-\log(p)$ alto se correlaciona con un mayor impacto en el flujo metabólico. Holm p es el valor de la significación dependiente del número de comparaciones ajustadas al valor p mediante el método de Holm Bonferroni; esta prueba estadística es utilizada en comparaciones múltiples para controlar errores tipo I asociados con el nivel de alfa. FDR (False Discovery Rate) (Tasa de descubrimiento falso) es la probabilidad de que una hipótesis nula sea cierta habiendo sido rechazada por el test estadístico; es utilizada como herramienta estadística en correlaciones múltiples para identificar errores tipo I. En el análisis global de los datos, valores incrementados (próximos a 1) tanto de Holm p como de FDR podrían indicar un falso positivo. Impact; El valor de impacto de la ruta se establece a través de un análisis de topología basado en la importancia del metabolito dentro de la ruta, es decir, un metabolito que actúa como punto de unión en una ruta provoca una mayor afectación cuando su concentración se ve modificada. Por otra parte, la significación es establecida a partir de un análisis de enriquecimiento de la ruta y de la ponderación calculada para cada metabolito dentro de un conjunto de datos. Una mayor significación y un valor p bajo se correlacionan con un mayor impacto en el flujo metabólico (Cordero-pérez et al., 2020). Details; muestra hipervínculos en donde se puede apreciar esquemáticamente la vía metabólica en cuestión, tiene los enlaces hacia la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) y la base de datos Small Molecule Pathway (SMP).

En el caso del grupo G8, las vías metabólicas asociadas al efecto de SCAF 13 son:

- a. Biosíntesis de Pantotenato y CoA
- b. Metabolismo de Taurina e Hipotaurina
- c. Metabolismo de B-alanina
- d. Metabolismo de amino azúcares y azúcares de nucleótidos
- e. Metabolismo de pirimidinas
- f. Biosíntesis de N-Glicanos

g. Metabolismo de tirosina

h. Biosíntesis de Ácidos Biliares Primarios

La importancia de estas vías se muestra en la Figura 34.

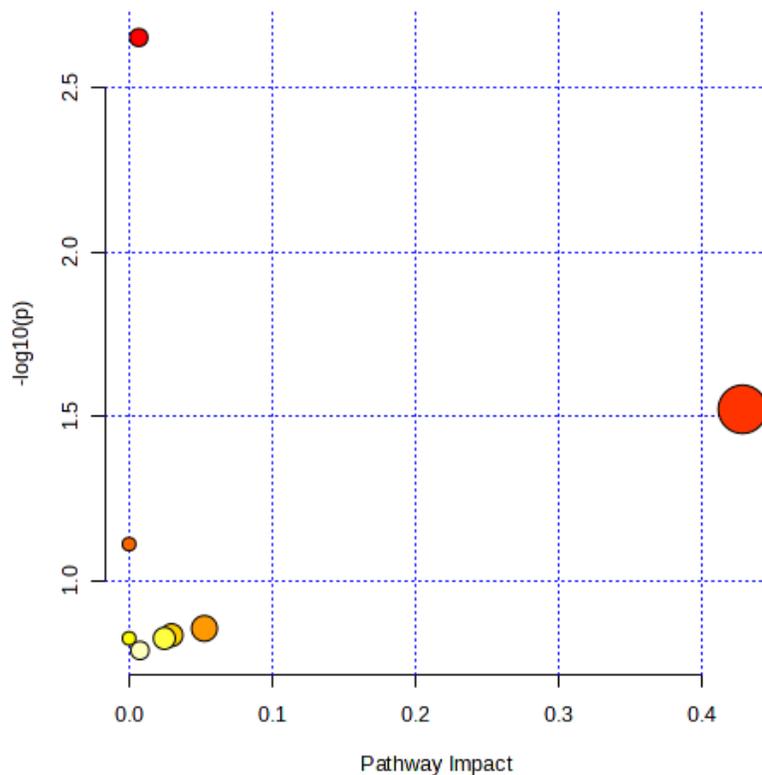


Figura 42. Impacto de las rutas de los metabolitos alterados en las vías metabólicas en células SW620 tratadas con SCAF 13 y detectados por metabolómica. La figura muestra las vías metabólicas relacionadas con los metabolitos obtenidos en las comparaciones, tanto por HILIC (-), RP-ESI (-) y RP-ESI (+) para G8 SCAF 13. En la figura se relaciona el color, tamaño del radio de la circunferencia y la distancia del punto (0,0) del gráfico, asumiendo que la vía con mayor puntaje es la que se muestra en un círculo de color rojo.

Los puntajes obtenidos en el análisis de vías metabólicas resultantes para SCAF 13 en células de CCR metastásica alojada en órgano anexo SW620, según análisis por las plataformas HILIC (-), RP-ESI (-) y RP-ESI (+) se resumen en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de vías metabólicas asociadas al efecto de SCAF 13.

| Pathway Name | Match Status | p | -LOG(p) | Holm p | FDR | Impact | Details |
|---|--------------|----------|---------|--------|--------|---------|---------------------------|
| Biosíntesis de Pantotenato y CoA | 2\20 | 0,00223 | 2,6517 | 0,1784 | 0,1784 | 0,0068 | KEGG, SMP |
| Metabolismo de Taurina e Hipotaurina | 1\8 | 0,030139 | 1,5209 | 1 | 1 | 0,42857 | KEGG, SMP |
| Metabolismo de Beta-Alanina | 1\21 | 0,077499 | 1,1107 | 1 | 1 | 0 | KEGG, SMP |
| Metabolismo de Pirimidinas | 1\39 | 0,13988 | 0,85424 | 1 | 1 | 0,05261 | KEGG, SMP |
| Biosíntesis de N-Glicanos | 1\41 | 0,14659 | 0,8339 | 1 | 1 | 0,02966 | KEGG |
| Metabolismo de azúcares amino y azúcares en nucleotidos | 1\42 | 0,14993 | 0,82412 | 1 | 1 | 0 | KEGG, SMP |
| Metabolismo de Tirosina | 1\42 | 0,14993 | 0,82412 | 1 | 1 | 0,02463 | KEGG, SMP |
| Biosíntesis de Acidos Biliares Primarios | 1\46 | 0,16317 | 0,78736 | 1 | 1 | 0,00758 | KEGG, SMP |

Datos tomados de la plataforma metaboanalyst 6.0 Solo se incluyen las rutas metabólicas con $p < 0,05$. Match Status (estado del emparejamiento); Indica la cantidad de metabolitos encontrados dentro del inventario de los mismos que coinciden con metabolitos intermediarios asignados a las vías bioquímicas. p; El valor p calculado para el análisis de la ruta metabólica refleja la probabilidad de obtener una diferencia igual o mayor que la observada cuando la hipótesis nula es cierta; -LOG(p) Un valor $-\log(p)$ alto se correlaciona con un mayor impacto en el flujo metabólico. Holm p es el valor de la significación dependiente del número de comparaciones ajustadas al valor p mediante el método de Holm Bonferroni; esta prueba estadística es utilizada en comparaciones múltiples para controlar errores tipo I asociados con el nivel de alfa. FDR (False Discovery Rate) (Tasa de descubrimiento falso) es la probabilidad de que una hipótesis nula sea cierta habiendo sido rechazada por el test estadístico; es utilizada como herramienta estadística en correlaciones múltiples para identificar errores tipo I. En el análisis global de los datos, valores incrementados (próximos a 1) tanto de Holm p como de FDR podrían indicar un falso positivo. Impact; El valor de impacto de la ruta se establece a

través de un análisis de topología basado en la importancia del metabolito dentro de la ruta, es decir, un metabolito que actúa como punto de unión en una ruta provoca una mayor afectación cuando su concentración se ve modificada. Por otra parte, la significación es establecida a partir de un análisis de enriquecimiento de la ruta y de la ponderación calculada para cada metabolito dentro de un conjunto de datos. Una mayor significación y un valor p bajo se correlacionan con un mayor impacto en el flujo metabólico (Cordero-pérez et al., 2020). Details; muestra hipervínculos en donde se puede apreciar esquemáticamente la vía metabólica en cuestión, tiene los enlaces hacia la base de datos de la enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) y la base de datos Small Molecule Pathway (SMP).

Las vías metabólicas afectadas por el SCAF 11 y el SCAF 13 en células SW620 expuestas a cada uno de los compuestos fueron la biosíntesis de Pantotenato y CoA, el metabolismo de amino azúcares y azúcares de nucleótidos, la biosíntesis de N-Glicanos y el metabolismo de tirosina que aunque no poseen valores de FDR y demás parámetros biestadísticos significativos si ofrecen una tendencia en cuanto a las vías que se promueven tras la inducción de elas SCAFs 11 y 13, dado que son los resultados que decide reportar la plataforma metaboanalyst 6.0. (Figura 43).

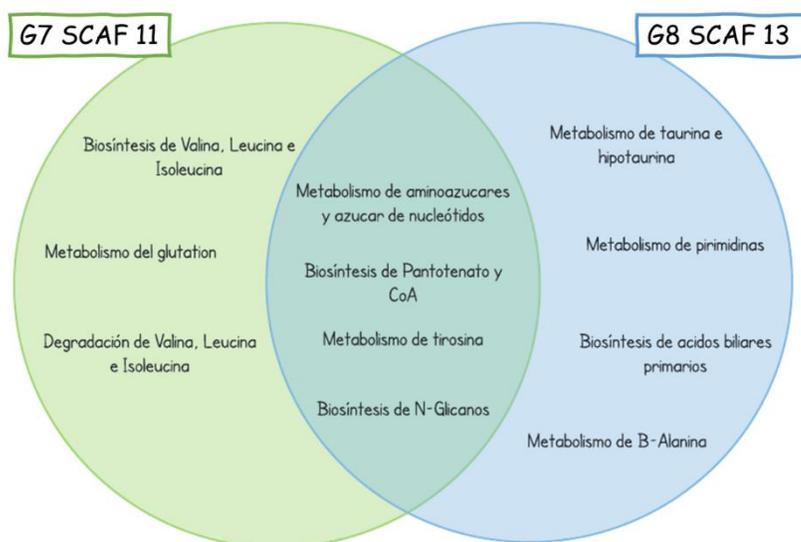


Figura 43. Diagrama de Venn en donde se relacionan las vías metabólicas afectadas por SCAF 11 y SCAF 13. Se observa las vías en común afectadas por SCAF 11 y SCAF 13 según el análisis de vías metabólicas usando Metaboloanalyst 6.0.

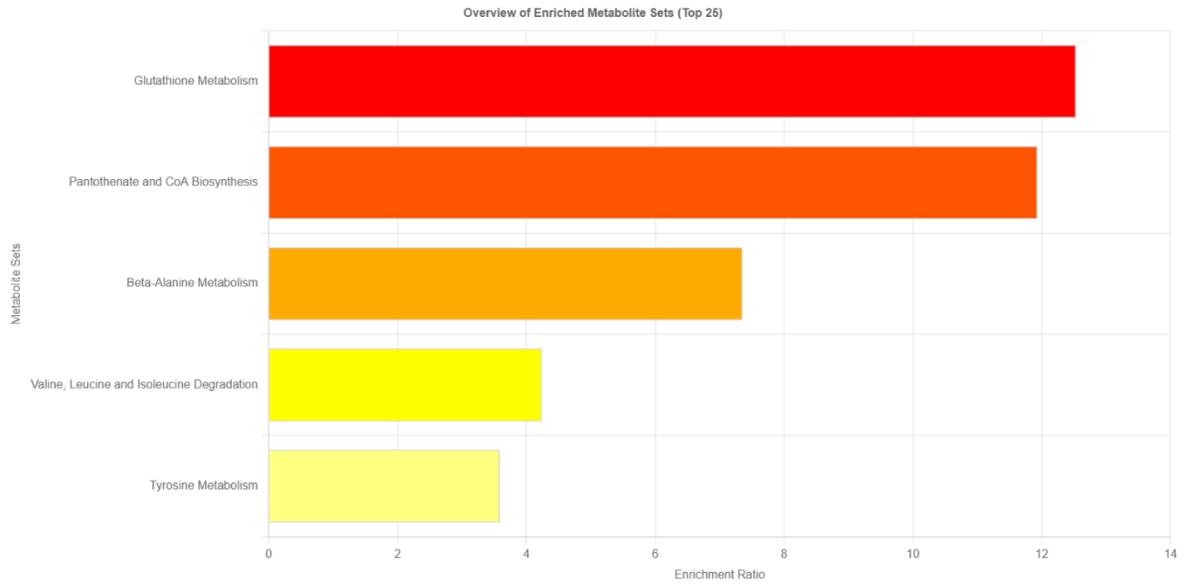
7.9.2 Análisis de enriquecimiento

El análisis de enriquecimiento de vías metabólicas se realizó con el fin de complementar los resultados obtenido en el análisis de vías bioquímicas. Este análisis permitió identificar en las células SW620 tratadas con SCAF 11 las siguientes vías:

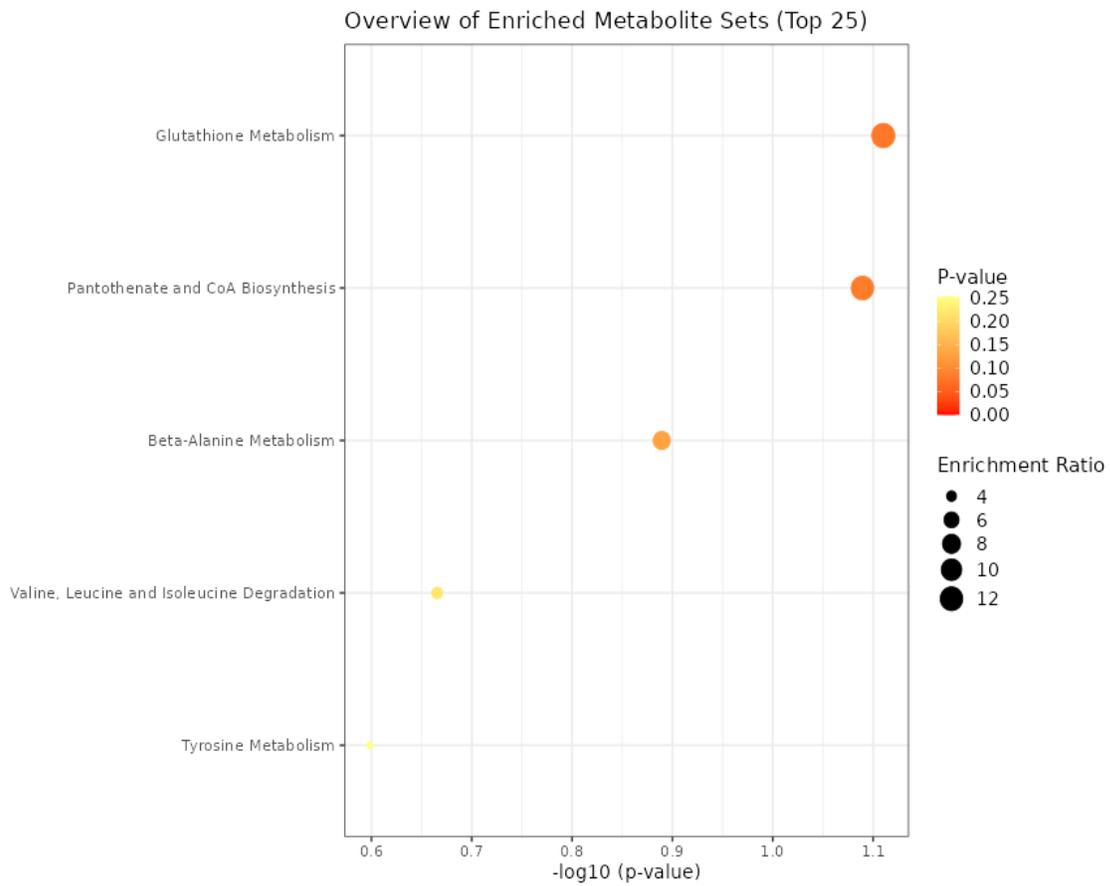
- a. Metabolismo del glutatión
- b. Biosíntesis del pantotenato y CoA
- c. Metabolismo de B-Alanina
- d. Degradación de Valina, Leucina e Isoleucina
- e. Metabolismo de Tirosina

De las 5 vías metabólicas afectadas identificadas por análisis de enriquecimiento, solo la vía involucrada en el metabolismo de B-Alanina fue nueva, mientras que las vías implicadas en el metabolismo del glutatión, en la biosíntesis del pantotenato y CoA, en la degradación de Valina, Leucina e Isoleucina y en el metabolismo de Tirosina ya habían sido detectadas previamente en el análisis de vías metabólicas. La importancia de cada una de las vías metabólicas afectadas se muestra en la Fig. 43. La plataforma de análisis permite definir la importancia o los mayores puntajes de acuerdo a la cantidad de metabolitos que fueron encontrados y que coinciden para una misma vía. Así, el metabolismo de glutatión y la biosíntesis de pantotenato y CoA se llevan los primeros puestos por tener 2 metabolitos que son intermediarios en estas vías metabólicas, tal como lo muestra las imágenes de la Figura 44.

a).



b).



c).

| Metabolite Set | Total | Hits | Expect | P value | Holm P | FDR | Details |
|--|-------|------|--------|---------|--------|-----|----------------------|
| Glutathione Metabolism | 20 | 1 | 0.0798 | 0.0776 | 1.0 | 1.0 | View |
| Pantothenate and CoA Biosynthesis | 21 | 1 | 0.0838 | 0.0814 | 1.0 | 1.0 | View |
| Beta-Alanine Metabolism | 34 | 1 | 0.136 | 0.129 | 1.0 | 1.0 | View |
| Valine, Leucine and Isoleucine Degradation | 59 | 1 | 0.236 | 0.216 | 1.0 | 1.0 | View |
| Tyrosine Metabolism | 70 | 1 | 0.279 | 0.252 | 1.0 | 1.0 | View |

Figura 44. Vías metabólicas obtenidas por los análisis de descripción general de los conjuntos de metabolitos enriquecidos con G7. La figura muestra las posibles vías metabólicas enriquecidas y los hits que determinan el lugar de importancia en la plataforma Metaboanalyst 6.0, ensayo realizado en células metastásicas en órgano anexo bajo la inducción de la SCAF de código 11 o grupo G7. a). Gráfico de barras que muestra las vías metabólicas obtenidas en el análisis de enriquecimiento, se describe las que tienen mayor importancia dada la longitud y el color siendo rojo el más importante ya que aquí hay mas coincidencia con lo metabolitos sometidos al análisis, luego naranja y por último amarillo b). Gráfico de puntos que ofrece una descripción general del conjunto de metabolitos enriquecidos. Indica la importancia y el orden de las vías metabólicas relacionadas con los metabolitos ingresados al análisis, para este gráfico se realiza bajo los parametrosde p-value donde la intensidad de color de amarillo a rojo decrece el valor de P-value asumiendo que mas lejos de 1 es menos importante y el grado de enriquecimiento dependiendo del tamaño del radio de la circunferencia (enrichment radio), esto es definido gracias a la cantidad de metabolitos obtenidos en los análisis de VIP presentados con anterioridad en este documento dentro del set de analistas sometidos a los análisis en la plataforma metaboanalyst metaboanalyst 6.0 para el grupo de metabolitos diferenciales para el análisis con la SCAF 11 y c). Conjunto de vías metabolicas que muestra los hits que se obtuvieron en el análisis de enriquecimiento, a su vez la totalidad e intermediarios metabólicos para cada vía, la expectativa, valor p, valor de Holm P, FDR que son parámetros de bioestadística y permiten generar confianza en los resultados obtenidos por las metodologías realizadas para llevar a cabo diferenes alternativas y así poder dar puntos, obteniendo el listado de vías metabólicas en orden de importancia. Obtenido en Metaboanalyst 6.0 para G7.

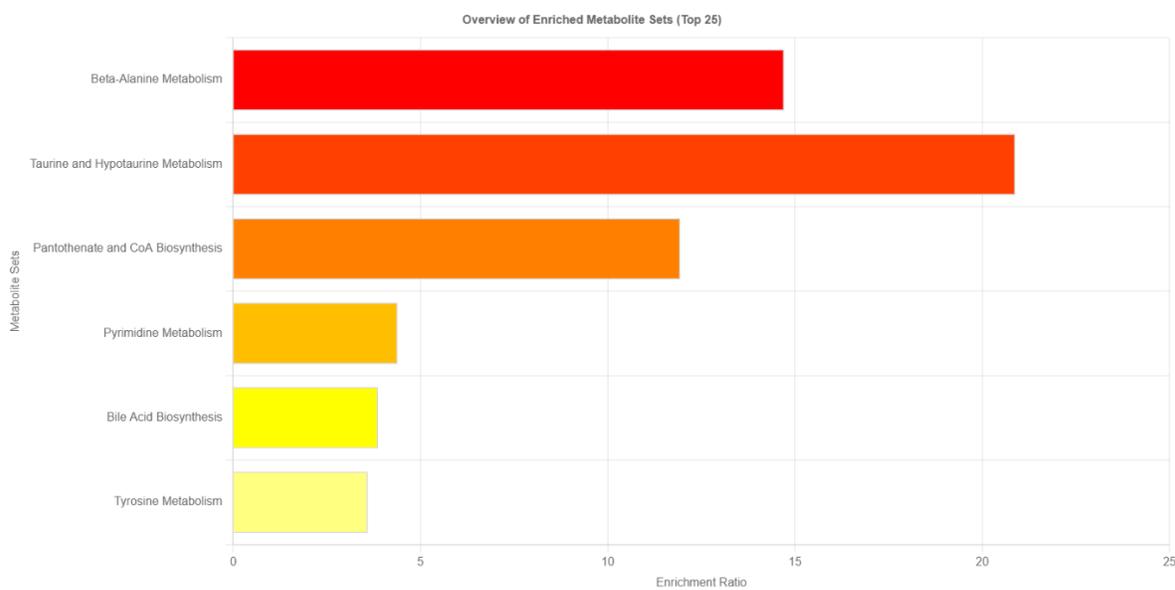
En las células SW620 tratadas con SCAF 13 (G8) las vias metabólicas detectadas fueron:

a. Metabolismo de Beta Alanina

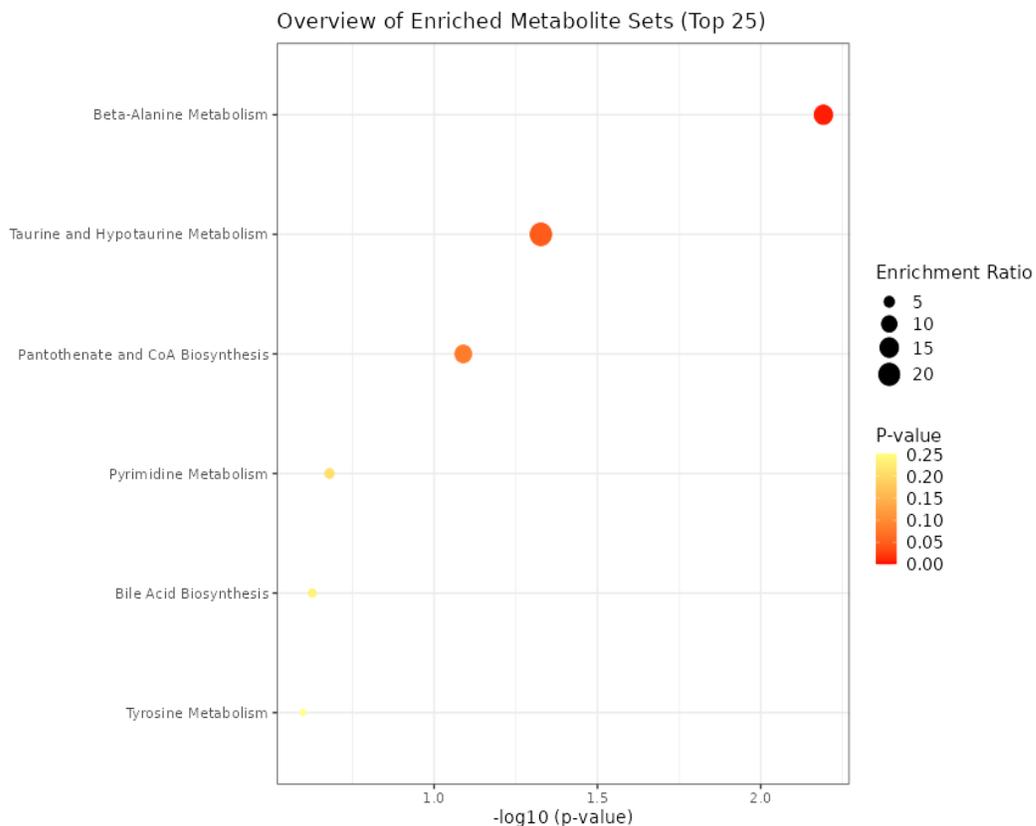
- b. Metabolismo de Taurina e Hipotaurina
- c. Biosíntesis de Pantotenato y CoA
- d. Metabolismo de pirimidinas
- e. Biosíntesis de Ácidos biliares
- f. Metabolismo de Tirosina.

De las 6 vías metabólicas afectadas identificadas por análisis de enriquecimiento, solo la vía involucrada en la biosíntesis de Ácidos Biliares fue nueva, mientras que las vías implicadas en el metabolismo de Beta Alanina, metabolismo de Taurina e Hipotaurina, Biosíntesis de Pantotenato y CoA, metabolismo de pirimidinas, biosíntesis de Ácidos Biliares y en el metabolismo de Tirosina ya habían sido detectadas previamente en el análisis de vías metabólicas. La importancia de cada una de las vías metabólicas afectadas se muestra en la Figura 45. Según el diagrama a continuación se presenta un orden de importancia dada algunas condiciones estadísticas que determinan la cantidad de metabolitos relacionados con las vías resultantes, así como los p-value y las coincidencias o hits, en este caso la vía del metabolismo de Beta Alanina se lleva el primer lugar, tal cual como se muestra en la Figura 45.

a).



b).



c).

| Metabolite Set | Total | Hits | Expect | P value | Holm P | FDR | Details |
|------------------------------------|-------|------|--------|---------|--------|------|----------------------|
| Beta-Alanine Metabolism | 34 | 2 | 0.136 | 0.00643 | 0.63 | 0.63 | View |
| Taurine and Hypotaurine Metabolism | 12 | 1 | 0.0479 | 0.0471 | 1.0 | 1.0 | View |
| Pantothenate and CoA Biosynthesis | 21 | 1 | 0.0838 | 0.0814 | 1.0 | 1.0 | View |
| Pyrimidine Metabolism | 57 | 1 | 0.228 | 0.209 | 1.0 | 1.0 | View |
| Bile Acid Biosynthesis | 65 | 1 | 0.259 | 0.236 | 1.0 | 1.0 | View |
| Tyrosine Metabolism | 70 | 1 | 0.279 | 0.252 | 1.0 | 1.0 | View |

<< < 1 > >> 20

Figura 45. Vías metabólicas obtenidas por los análisis de descripción general de los conjuntos de metabolitos enriquecidos con G8. La figura muestra las posibles vías metabólicas enriquecidas y los hits que determinan el lugar de importancia en la plataforma Metaboanalyst 6.0, ensayo realizado en células metastásicas en órgano anexo bajo la inducción de la SCAF de código 13 o grupo G8. a). Gráfico de barras que muestra las vías metabólicas obtenidas en el análisis de enriquecimiento, se describe las que tienen mayor importancia dada la longitud y el color siendo rojo el más importante ya que aquí hay mas coincidencia con lo metabolitos sometidos al análisis, luego naranja y por último amarillo, b). Gráfico de puntos que ofrece una descripción general del conjunto de metabolitos enriquecidos, indica la importancia y el orden de las vías metabólicas relacionadas con los metabolitos

ingresados al análisis, este gráfico se realiza bajo los parámetros de p-value donde la intensidad de color de amarillo a rojo decrece el valor de P-value asumiendo que mas lejos de 1 es menos importante y el grado de enriquecimiento dependiendo del tamaño del radio de la circunferencia (enrichment radio), esto es definido gracias a la cantidad de metabolitos obtenidos en los análisis de VIP presentados con anterioridad en este documento dentro del set de analistas sometidos a los análisis en la plataforma metaboanalyst 6.0 para el grupo de metabolitos diferenciales para el análisis con la SCAF 13; y c). Conjunto de vías metabólicas que muestra los hits que se obtuvieron en el análisis de enriquecimiento, a su vez la totalidad e intermediarios metabólicos para cada vía, la expectativa, p-value, valor de Holm P, FDR que son parámetros de bioestadística y permiten generar confianza en los resultados obtenidos por las metodologías realizadas para llevar a cabo diferenes alternativas y así poder dar puntos, obteniendo el listado de vías metabólicas en orden de importancia. muestra las posibles vías metabólicas enriquecidas y los hits que determinan el lugar de importancia. Obtenido en Metaboanalyst 6.0 para G8.

Asi mismo, la comparación de las vías metabólicas afectadas identificadas por el análisis de enriquecimiento permitió identificar como vias afectadas en común por las SCAF 11 y 13 la biosíntesis de Pantotenato y CoA, el metabolismo de B-Alanina y el metabolismo de tirosina (Figura 46).

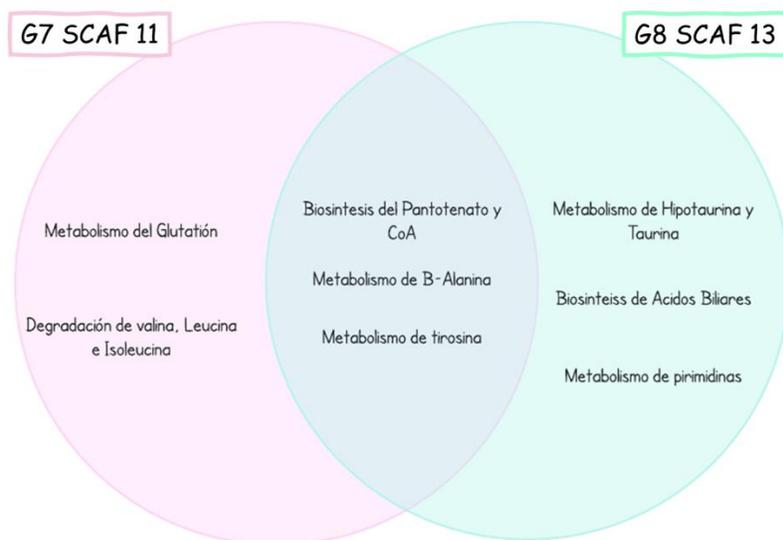


Figura 46. Diagrama de Venn en donde se relacionan las vías metabólicas afectadas por SCAF 11 y SCAF 13. Se observa las vías en común afectadas por SCAF 11 y SCAF 13 según el análisis de enriquecimiento de vias metabólicas con MetaboAnalyst 6.0.

Por último, la comparación de las vías metabólicas afectadas por SCAF 11 y SCAF 13 combinado el análisis de vías metabólicas con el análisis de enriquecimiento permitió identificar la vía de la biosíntesis del Pantotenato y CoA y la vía del metabolismo de Tirosina como las vías afectadas tanto por SCAF 11 como por SCAF 13 (Figura 47).

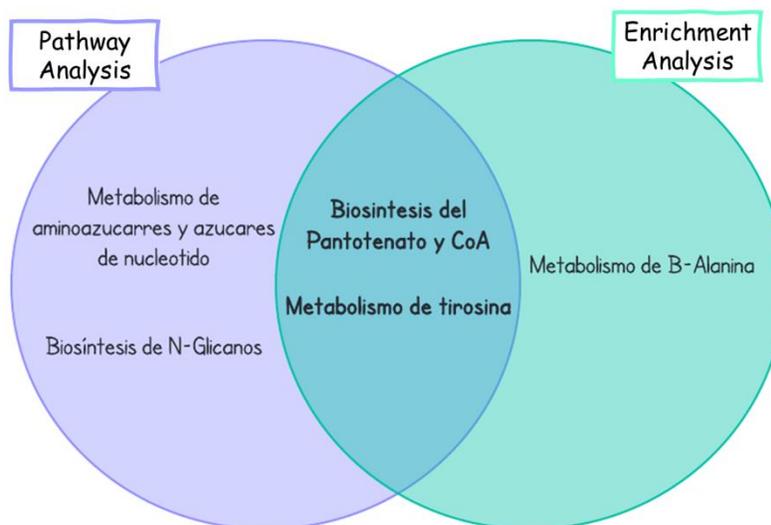


Figura 47. Diagrama de Venn en donde se relacionan las vías metabólicas afectadas por SCAF 11 y SCAF 13. Se observa las vías en común afectadas por SCAF 11 y SCAF 13 según el análisis de vías metabólicas en comparación con el análisis de enriquecimiento de vías metabólicas con MetaboAnalyst 6.0.

8. Discusión

El CCR es una enfermedad genéticamente heterogénea que se desarrolla por progresión de adenoma a carcinoma. Estos cambios ocurren en etapas que, a su vez, están asociadas con la gravedad de la enfermedad (H. Nguyen et al., 2018). Por lo tanto, este estudio evaluó líneas celulares de CCR en niveles en fase premetastásica (SW948) pero también metastásicas *in situ* (SW48), y metastásico invasivo (SW620), para evaluar e identificar una respuestas diferenciales de estas células a la acción de las SCAF y SCA no F y luego identificar metabolitos prometedores para el desarrollo de terapias antitumorales específicas para el CCR.

Las líneas celulares de CRC mostraron diferencias en los fenotipos moleculares y la expresión de genes mutados (Tabla 1). En todas las líneas celulares de CCR evaluadas en este estudio, el gen TP53, que codifica la proteína p53 implicada en el control del ciclo celular, la senescencia, la apoptosis y la reparación del ADN, presenta diferentes mutaciones, tanto homocigotas como no determinadas ver (Tabla. 3) , entre las que se destaca la mutación R273H, que impide que la proteína P53 tenga una conformación regular y se una a la proteína 53BP2/ASP2 e induzca la apoptosis (Soussi & Wiman, 2007). Además, se ha demostrado que ésta puede generar una desregulación del ciclo celular y afectar de forma anormal los procesos de proliferación (X. L. Li et al., 2015; Rivlin et al., 2011) y una reparación deficiente del daño al ADN. Además de las mutaciones en el gen TP53, tanto las líneas celulares SW948 premetastásicas como las líneas celulares metastásicas invasivas SW620, tienen mutaciones en los genes *KRAS*, *PIK3CA* y *APC*, que pueden afectar los procesos del ciclo celular, la proliferación y la angiogénesis (F Aldecoa & Ávila, 2021).

Las mutaciones en el gen APC promueven la proliferación celular, permitiendo la activación o fosforilación de proteínas como BCL2, IAP, PCNA, eNOS y A20, que disminuyen la apoptosis y aumentan la supervivencia celular (Lu Zhang & Shay, 2017). Solo SW620 mostró mutaciones en el gen SMAD4 que pueden promover procesos metastásicos (B. Zhang et al., 2011). Por el contrario, la línea celular metastásica *in situ* SW48; además, de mutaciones en el gen TP53, mostró mutaciones en los genes *CTNNB1*, *EGFR* y *FBXW7*. El *CTNNB1*, es un coactivador importante cascada abajo de la vía de señalización oncogénica Wnt; las mutaciones en el gen CTNNB1 están implicadas en la oncogénesis (Korinek et al., 1997). A su vez, la vía de señalización de EGFR desempeña un papel fundamental en el crecimiento tumoral y la progresión de diversos cánceres, principalmente en tumores sólidos, incluido el CCR (Mitsudomi, 2010). Por otro lado, las mutaciones del gen FBXW7 son una de las causas importantes de carcinogénesis (Akhoondi et al., 2007; Y. Liu et al., 2023); además, FBXW7 es uno de los genes mutados con mayor frecuencia durante el inicio y la progresión del CCR (Karczmarski et al., 2019) y el estado alterado de FBXW7 (mutación y baja expresión) puede estar asociado con el pronóstico de CCR (Kawashita et al., 2017); sin embargo, los resultados varían entre los diferentes estudios.

En conclusión, las líneas celulares de CCR SW48, SW620 y SW948 tienen mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que contribuyen a la proliferación, supervivencia y angiogénesis

descontroladas que podrían promover la metastasis en el CCR que aunque ya se conocían por aparte es el primer reporte que lo genera en conjunto para este grupo de células simulando una mirada amplia abarcando diferentes fases del CCR.

Las diferencias entre la expresión de oncogenes específicos y genes supresores de tumores y el tipo de mutación podrían afectar la sensibilidad de las líneas celulares de CCR a los SCAF. Desde un punto de vista estructural, los SCAF más citotóxicos para células SW948 comparten las siguientes características: (i) una distribución aleatoria del atributo de citotoxicidad para las sales con 3 y 4 carbonos que están en la cadena alifáticos (C3 y C4), con valores de CC_{50} similares entre sí; (ii) la presencia de un sustituyente trifluorometilo unido a la posición para o meta de los anillos aromáticos, aunque seis de siete SCAF están sustituidos en para; (iii) la presencia o no de un átomo de halógeno unido a uno de los grupos metilo de la cabeza de amonio cuaternario, con una distribución aleatoria del patrón de citotoxicidad para las sales cloradas, yodadas o no halogenadas, lo que sugiere que este átomo de halógeno no es muy relevante para la propiedad de citotoxicidad. La SCAF **1** muestra una baja citotoxicidad, seguido de SCAF **2**, que son (i) sales con tres carbonos en la cadena alifática, (ii) con o sin halogenato de C en la cabeza cuaternaria, y (iii) no fluorados o monofluorados en los anillos aromáticos. De acuerdo con esta observación, para las células SW948 premetastásicas, la cantidad de carbonos en la cadena alifática no es muy relevante. Además, para la línea SW948, la presencia o ausencia de un átomo de halógeno unido a uno de los grupos metilo de la cabeza cuaternaria no parece relevante tampoco, y la citotoxicidad podría resultar entonces de una combinación compleja de variables estructurales en el catión orgánico.

En el caso de las células SW48 CCR, las SCAF más citotóxicos comparten las siguientes características: (i) una cadena de cuatro carbonos entre el átomo de nitrógeno cuaternario y la porción vinilo; (ii) un sustituyente trifluorometilo en los anillos aromáticos en posición para, de modo que las moléculas parasustituidas sean ligeramente más citotóxicas que las metasustituidas; (iii) la presencia o no de un átomo de yodo, unido a uno de los grupos metilo de la cabeza de amonio cuaternario (CH_2I vs. CH_3). La SCAF menos citotóxica es la **3**. Una distribución aleatoria general del comportamiento citotóxico de las sales estudiadas sugiere que, para este tipo de línea celular cancerosa, la longitud de la cadena carbonada alifática no es muy relevante. Sin embargo, cualitativamente, las sales que

poseen una cadena alifática de cuatro carbonos tienden a comportarse como las más citotóxicas (Fernandez et al., 2018), además de los resultados experimentales que se muestran en la Tabla 5.

La presencia o ausencia de un átomo de halógeno unido a uno de los grupos metilo de la cabeza cuaternaria no parecen relevantes, o bien la citotoxicidad resulta de una combinación compleja de variables estructurales en el catión orgánico. Como se mencionó, las SCAF citotóxicas **5** y **11-14** mostraron un ECP fuerte (+++). Estas sales llevan un átomo de cloro (patrón C-Cl o C-I o C-CH₃) en la cabeza de amonio cuaternario y un sustituyente aromático CF₃ (*meta* y *para*, respectivamente), dado lo anteriormente descrito en relación a estudios previos que se han realizado con la misma serie de compuestos. Es importante señalar que las características epigenéticas de las células SW48 significan que no responden bajo una ruta definida al 5-FU (Goyle & Maraveyas, 2006) y se esperaría que tuvieran un comportamiento similar en presencia de SCAFs **11**, **13**, y **14**, a pesar de ser el 5-FU más citotóxico (Goyle & Maraveyas, 2006). Además, y aunque la estructura del 5-FU no es similar a la del SCAFs, se sabe que es una alternativa eficaz para el tratamiento del CCR y otros cánceres ya que actúa como un bloqueador en la metilación del ADN y, como observamos en nuestros análisis, el comportamiento de estas sales de fluoruro es similar al del 5-FU, sugiriendo así que estas moléculas son óptimas para desarrollar una actividad antitumoral.

En la práctica, los pacientes con CCR con *KRAS* mutado y estado de hipermetilación (perfil epigenético) no se benefician de la monoterapia con 5-FU, porque el 5-FU no es eficaz en células de CCR con este genotipo, como en la línea celular SW48 (Tabla 5). Sin embargo, en este trabajo observamos que estas estructuras químicas las SCAFs si ejercen el efecto deseado generando efectos citotóxicos en esta línea celular. Se conoce que las células neoplásicas tienen genes mutados o hipermetilados que conlleva entre otras cosas a sistemas de reparación deficientes contra los daños inducidos por sustancias citotóxicas como es el caso de esta librería de compuestos, lo que podría fortalecer la dinámica citotóxica de las sales analizadas en este estudio, sin embargo, y debido a los fenómenos de duplicación observados en los cultivos celulares y a la detención en la duplicación celular una vez fueron inducidos los compuestos sería correcto afirmar que estas SCA están generando efectos adversos y tóxicos en las mismas, sería interesante contar con un análisis de genotipificación y de características epigenéticas que indique cuáles son los genes afectados y que se pueda comparar con lo planteado en la literatura, así se podría tener una visión más global sobre

los efectos citotóxicos que se generan una vez se han inducido la librería de compuestos evaluada en este estudio.

De manera similar, en cuanto a la línea celular SW948, las SCAF citotóxicas para las células SW620 comparten las siguientes características: (i) una distribución aleatoria del patrón de citotoxicidad para la longitud de las cadenas alifáticas de 3 o 4 átomos de carbono, se observaron cuatro SCAFs promisorios con los códigos del **11-14** que poseen 4 átomos de carbono en la cadena alifática; (ii) la presencia de flúor o un sustituyente CF₃ unido a los anillos aromáticos, ya sea en posición *para* o *meta*, aunque cinco de ocho SCAF son sales sustituidas con trifluorometilo, principalmente en posición *para*; (iii) si hay o no un átomo de halógeno, unido a uno de los grupos metilo de la cabeza de amonio cuaternario, con una distribución aleatoria del patrón de citotoxicidad para las sales cloradas, yodadas o no halogenadas, lo que sugiere que este átomo de halógeno no es significativamente relevante por la propiedad de citotoxicidad contra las células CRC SW620. Aunque no existe un perfil claro, se sugiere que las células de CCR metastásico respondan más a las SCAF unidas con cuatro átomos de carbono en la cadena alifática como los sustituidos con *para*-CF₃.

Los resultados indican que las SCAF **9-14** que tienen CF₃ son una fuente de potenciales moléculas antitumorales contra el CCR en diferentes estadios que presentan las líneas celulares evaluadas principalmente en el tipo C de Dukes, grado III. Debido a que no existe un comportamiento farmacocinético ideal que deba tener un fármaco candidato en particular, ya que depende de los requisitos del objetivo, estos resultados sugieren que las SCAF, excepto los SCA no F **1** y **2**, aunque presentan una farmacología deficiente para la administración oral, podrían generar ensayos en donde se evalúe una ruta más exitosa de administración. Adicionalmente podría ser evaluados en un ensayo de administración por vía parenteral ya sea por vía intramuscular o intravenosa.

Todos los SCAF mostraron más citotoxicidad que el 5-FU en el tejido colorrectal de ratones BALB/c sanos con una distribución aleatoria del patrón de citotoxicidad, en comparación con las características estructurales abordadas. Aunque este no es un resultado que se destaque, cabe indicar que varias SCAF exhiben una citotoxicidad más baja contra las células PBMC (sanas). Las SCAF **3, 4, 6, 7, 8, 10** y **12-14** resultaron ser menos citotóxicos (o comparables) que el 5-FU contra células PBMC sanas, en comparación a CC₅₀ para 5-FU. Si bien los SCAF **13** y **14** tienden a ser moléculas citotóxicas contra

las líneas celulares SW48, SW948 y SW620, estas sales resultaron ser las menos citotóxicas para las células PBMC de control sanas. Significa que al menos ocho sales exhiben mejores IS que el 5-FU (Tabla 5). Además, se observó un nivel fundamental de selectividad para todos los SCAFs al comparar su citotoxicidad en células TCRM (sanas) versus citotoxicidad en las tres líneas celulares de CCR estudiadas (SW48, SW948 y SW620). De hecho, según la Tabla 6, los SCAFs **13** y **14** (principalmente el último) exhibieron valores de IS comparables al 5-FU (columnas cuatro, cinco y seis, entradas 13 y 14). El mejor valor de IS se encontró para SCAF **14** (IS=28,9 para células TCRM frente a SW620), que equivale a IS de 5-FU dentro del error experimental (aproximadamente las mismas líneas celulares); sin embargo, esta sal tuvo unos efectos citopáticos agrasivos a nivel general para todos los cultivos; por lo tanto no fue considerada para continuar en las siguientes fases de análisis.

La selectividad de los SCAF para las células CCR se confirmó en cultivos primarios de TCRM y CMSP, en donde las SCAF poseen una mayor citotoxicidad para las células CCR SW48, SW620, SW948, en los fibroblastos de la piel Detroit 551 y los PMBC; sin embargo, en el TCRM, este grupo de moléculas presentó menor toxicidad, al igual que los valores de selectividad indicando que estos compuestos no generar deterioros en estos tejidos, lo que sustenta que podrían ser potenciales candidatos para el desarrollo de futuros agentes antitumorales. La citotoxicidad de todos las SCAF y SCA no F, excepto la SCAF **11**, fue baja o moderada, con valores de CC_{50} que oscilaron entre 102 μ M y 449 μ M. Aunque todos las SCAF y SCA no F también mostraron una alta citotoxicidad para las PBMC, las concentraciones a las que se alcanza la concentración tóxica media son mayores que las observadas para las líneas celulares de CCR. La citotoxicidad de las SCAF podría estar asociada con daño mitocondrial porque el MTT detecta la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa; si esta enzima se altera lo más probable es que las mitocondrias fallen y generen señales de muerte celular demasiado pronto; no obstante, este daño podría corregirse y se produciría la recuperación celular. Por otro lado, debido a que estos compuestos son altamente tóxicos, lo más probable es que el daño sea más significativo que los eventos de reparación en las mitocondrias, y posiblemente no haya muerte celular debido exclusivamente al daño mitocondrial sino sumado a otros efectos adversos como deterioro en otros orgánulos celulares como la membrana plasmática (Diaz-Vegas et al., 2020).

Los análisis *in silico* proporcionan información sobre parámetros fisicoquímicos, permitiendo una aproximación a algunas propiedades relacionadas con el potencial fármaco-similar de los SCAF en

estudio. Los análisis de estos parámetros fueron realizados en las plataformas online SwissADME y ADMETLab 2.0; en primer lugar, se observó que todos los SCAF evaluados son altamente lipófilos y poco solubles en solventes polares ya que, según los niveles máximos de biodisponibilidad, están fuera de los parámetros estándar que debe tener un fármaco para ser administrado por vía oral. Esta observación es congruente con las estructuras químicas de los compuestos ya que, en la cabeza catiónica, donde el átomo de nitrógeno está tetrasustituido con 2 o 3 grupos metilo, una cadena alifática de 5 o 6 carbonos y un átomo de cloro o yodo, no son suficientes para aumentar la polaridad de la molécula. Además, los grupos trifluorometilo *para* CF₃ (pCF₃) o *meta* CF₃ (mCF₃) o difluor (mF₂ o pF₂) ubicados en los dos anillos aromáticos al final de la cadena no son suficientes para disminuir estos valores de liposolubilidad tal cual como se observa en la Tabla 6.

La verificación de propiedades fisicoquímicas de manera *in sillico* se realizaron a través de dos plataformas bioinformáticas como lo son ADMET 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) y Swiss ADME (<http://www.swissadme.ch/>), las cuales revisan parámetros fisicoquímicos como Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y toxicidad (en el caso de ADMET2.0) para compuestos que podrían ser ofertados como fármacos ingeridos de manera oral. Estas plataformas hacen parte del análisis que hacen los modelos QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationships*) que son algoritmos matemáticos complejos que permiten facilitar, economizar y acelerar una importante tarea en campos como la química o el desarrollo de fármacos: la evaluación predictiva de las propiedades o actividades biológicas de compuestos químicos a partir exclusivamente de su estructura molecular (Gozalbes & Vicente de Julián-Ortiz, 2018).

Estos análisis *in sillico* permitieron obtener un acercamiento sobre algunas propiedades relacionadas con la potencialidad de que las SCAF y no F en estudio presentaran la posibilidad de ser oralmente drogables o no. En primer lugar, se observó que todos los compuestos SCAF y SCA no F evaluados son altamente lipofílicos y poco solubles en solventes polares, dado que al revisar los diagramas de biodisponibilidad de la librería de los 16 compuestos su polaridad es baja o relativamente nula puesto que según los niveles máximos de biodisponibilidad muestran que estos compuestos son altamente apolares ya que se salen de los parámetros normales que debe tener un fármaco para ser administrado de manera oral. Lo anterior es congruente con las estructuras químicas de los mismos, ya que en la cabeza catiónica donde se encuentra el átomo de nitrógeno tetrasustituido con 2 grupos

metilo, un etilo, o un átomo de cloro o yodo unido a un metil, que se encuentra unido a una cadena alifática de 5 o 6 carbonos, no son suficientes para aumentar la polaridad de la molécula, incluso los grupos trifluoro metilo en posiciones para o meta (pCF_3 o mCF_3) o flúor (pF o mF) ubicados en los dos anillos difenilvinilo al final de la cadena no son suficientes para que estos valores de liposolubilidad disminuyan.

Por otra parte, se observó que las masas moleculares de esta librería de compuestos oscilan entre 457 a casi 592 g/mol, lo que indica que son moléculas de alto peso molecular y que por tener una masa mayor a 500 g/mol exceden los parámetros permitidos en fármacos para biodisponibilidad oral, este parámetro también es contemplado dentro de las 5 de Lipinsky indicando que para estudios *in silico* los valores de más en este tipo de compuestos no deben superar los 500 g/mol, porque podrían no asimilarse de manera oral fácilmente (Lagorce et al., 2017); sin embargo estos compuestos podrían estar adecuándose a otras maneras de administración para los cuales estas moléculas si tienen una oportunidad de seguir en los procesos de evaluación previa a pasar a una fase preclínica.

Por otra parte, se evaluó en este set de moléculas el parámetro de área de la superficie topológica polarizada (TPSA) que se refiere a el área de la superficie topológica, la cual está definida por la suma de las contribuciones superficiales tabuladas de fragmentos polares en una molécula, el valor óptimo de este parámetro se encuentra entre 0 – 140 según la regla de Veber (Glaxo Smith Kline); este parámetro ha sido un descriptor útil para la predicción de las propiedades del transporte de fármacos, especialmente en la absorción intestinal y penetración de la barrera hemato-encefálica (Ensuncho et al., 2017; Fernandes & Gattass, 2009); valores altos de TPSA (mayores que 140 Å²) son típicos de moléculas que poseen una baja capacidad para la penetración de las membranas celulares, mientras que moléculas con valores de TPSA pequeños (menores que 60 Å²) son fácilmente transportadas y absorbidas. Sin embargo, es importante delimitar la interpretación del descriptor TPSA; ya que en compuestos con un nitrógeno cuaternario como es el caso de estas sales y aunque tienen un valor nulo de TPSA, es poco probable que penetre membranas biológicas a través de difusión pasiva. Por otra parte, algunos compuestos con valores altos de TPSA podrían atravesar las membranas, si son sustratos de sistemas de transporte activo (Ensuncho et al., 2017).

Las SCAF y SCA no F al no poseer átomos tan polares como el azufre y el fósforo su TPSA disminuye al punto de llegar a 0,00 Å² para todos los compuestos de la librería, sugiriendo que la polaridad es casi nula en estas moléculas; sin embargo, al ser moléculas que poseen nitrógenos cuaternarios la posibilidad de ingreso a la célula estaría complejo a menos que exista un sistema de apoyo para esto. No obstante, Las SCA en general, son detergentes catiónicos que exhiben una alta actividad superficial y una fuerte reactividad hacia las membranas biológicas. Pueden afectar la fluidez de la bicapa lipídica, perturbar las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas específicas de las proteínas y lípidos de la membrana y cambiar la asimetría de los lípidos (Oblak et al., 2016). Sugiere entonces que estas sales tienen un comportamiento de tipo apolar similar a estructuras celulares como algunas regiones de los fosfolípidos anfipáticos que son componentes de las membranas celulares y que podría facilitar su acceso a la membrana sin necesidad de fragmentarse, o requerir de otro apoyo para el ingreso a la misma.

Parámetros como la cantidad de hidrógenos donadores (nHD) que se refiere a aquellos hidrógenos que son altamente polares ya que son los únicos protones del núcleo, y que pueden estar unidos a átomos fuertemente electronegativos, principalmente nitrógeno, oxígeno o flúor (NOF) entidades que se denominan como aceptores y debido a que hay una carga negativa parcial equivalente en el átomo unido al hidrógeno (principalmente NOF), este átomo puede aceptar enlaces de H de otros átomos. Sin embargo, para todos los compuestos el valor de este parámetro fue de cero, lo que sugiere que, debido a su carácter tan apolar la posibilidad de generar puentes de hidrógeno es reducida. Otro parámetro que se evaluó fue el número de hidrógenos aceptores (nHA). El aceptor de hidrógeno es un átomo electronegativo de una molécula o ion vecino que contiene un par libre que participa en el enlace de hidrógeno.

Se encontró que los valores varían entre las herramientas informáticas consultadas esto puede ser debido a los algoritmos que manejan cada una de ellas, sin embargo, estas moléculas poseen por lo menos un hidrógeno aceptor lo que sugiere que por lo menos un hidrógeno podría ser captado para generar otro tipo de enlace y apoyar la formación de otra sustancia, o bien podría ser usado en la unión a alguna estructura celular y permitir el ingreso o la permanencia en las células con las que hicieron contacto. Aunque podría generar contradicciones entre estos dos parámetros, en la posibilidad que tienen estos compuestos de generar puentes de hidrógeno o no, lo cierto es que, y

aunque debido a su apolaridad existe una mínima posibilidad de hacerlo, tal vez esta podría ser una de las estrategias que utilizan estas moléculas para el ingreso o el contacto con las células utilizadas en el estudio. Un estudio demostró la mayor eficacia de los quimioterapéuticos cuando se combinan con iones de amonio cuaternario. Esta combinación con clorambucilo o melfalán (quimioterapéuticos populares) aumenta la lipofilicidad del fármaco y su capacidad para penetrar el plasma y la membrana mitocondrial (Giraud et al., 2002).

En lo relacionado a la cantidad del número de rotaciones de enlaces, para los compuestos de la librería que presentan una insaturación al final de la cadena carbonada antes del grupo difenil vinilo podría impedir la rotación estérica libre de este conjunto y los grupos para o meta CF₃ o para o meta F, haciendo que este extremo de la molécula sea más rígido y esta cualidad podría permitir el anclaje a determinadas estructuras lipofílicas como son las membranas celulares; por otro lado el extremo donde se encuentra la cabeza catiónica si permite estas rotaciones con mayor libertad y podría permitir los giros que se marcan en los resultados que lanzan ambas plataformas de análisis para la librería de compuestos, los valores óptimos según las plataformas analizadas se encuentran entre 0 y 11, sugiriendo entonces que son moléculas apropiadas para esta condición, cumpliendo con el rango óptimo requerido.

Si se observan los parámetros de lipofilicidad, tales como LogS (Log of the aqueous solubility), LogP (Log of the octanol/water Log_{o/w} partition coefficient) y logD (LogP at physiological pH 7.4), los resultados sugieren que todas las moléculas que pertenecen a la librería cumplen con el parámetro de LogS ya que este tiene unos rangos de solubilidad acuosa óptima de -4 hasta 0.5 log mol/L. Sin embargo, parámetros como LogP y LogD no se cumplen en este conjunto de compuestos ya que exceden los valores óptimos ubicados entre 0-3 para LogP y 1-3 de LogD, sugiriendo que tienen un coeficiente de relación entre el octanol/agua muy altos, confirmando su apolaridad dado por la afinidad hacia los lípidos cuando esta disuelta en agua. Este parámetro, LogP, permite explicar, por ejemplo, las interacciones fármaco-receptor, fármaco-membranas biológicas, dado que LogP, es una medida que indica la preferencia del compuesto de ser soluble en agua o solventes orgánicos y describe la hidrofobicidad de una sola forma sugiriendo que los compuestos de la librería son en su gran mayoría apolares.

Por último los resultados para el parámetro LogD que relaciona a LogP pero un pH fisiológico 7.4, es el coeficiente de octanol/agua a pH de 7,4, se encuentra elevado para la mayoría de los compuestos sugiriendo que a un pH fisiológico de 7.4 los compuestos que tienen grupos ionizables que existen en solución como una mezcla de diferentes formas iónicas. La ionización de esos grupos, por tanto, la proporción de las formas iónicas depende del pH. Debido a los resultados que arrojaron estos parámetros de solubilidad se podría afirmar que estas sales son compuestos apolares y que posiblemente exista una asociación a estructuras que compartan similitudes químicas como las membranas biológicas y que un valor de pH fisiológico como 7,4 tal vez la afinidad y la asociación entre las sales y las membranas podría no ser tan efectivo. Sin embargo, no se descarta que, si pudiesen estar interactuando, pero de una manera no tan fuerte, podría estar esta interacción apoyada por otro mecanismo de ayuda para la entrada de estas sales a las células usadas en el estudio.

Es interesante observar que el set de moléculas candidatas poseen un valor muy bajo de hidrofiliidad ya que, dada su estructura y la cantidad de anillos aromáticos, su cadena alifática con una insaturación y con una longitud de 5 o 6 carbonos en enlaces saturados hacen que estas moléculas sean muy poco solubles en agua y que, aunque tengan una cabeza catiónica no es suficiente para aumentar este tipo de hidrosolubilidad.

Según lo propuesto por Lipinsky y Veber como reglas para consolidar a una molécula como buen candidato para ser usado como fármaco en la vía oral, y aunque esta librería de compuestos podrían postularse como moléculas promisorias para continuar en el estudio de agentes quimioterapéuticos dado que cumplen parcialmente las reglas de Lipinsky y Veber, algunas de las normas como nHA y nHD entre otros, debido a lo evidenciado y analizado son compuestos con baja solubilidad en agua y por el contrario muy soluble es en solventes de tipo apolar y que tal vez su paso por la vía gástrica sería complejo, sin embargo si se implementara el uso de nanoencapsulados podría apoyar la idea en la que estos compuestos podrían llegar "intactos" hasta el tracto digestivo donde se promueve el metabolismo a través de la absorción de nutrientes, facultando así una posible alternativa de quimioterapia oral con algún tipo de recubrimiento algo así como un nano encapsulado.

Todas estas propiedades en conjunto han demostrado ser un descriptor útil en muchos modelos para estimar reglas y definir de manera rápida algunas propiedades de absorción, distribución, metabolismo

y excreción (ADME), especialmente con respecto al cruce de barreras biológicas como la absorción y el paso a través de la barrera hematoencefálica (Lagorce et al., 2017). Indicando que la librería de compuestos analizados tiene un potencial interesante para que se implementen análisis de manera *in vitro* que permitan definir si existe la aplicabilidad farmacológica de las SCAFs o SCA no F en regímenes de tratamiento individualizados o personalizados, haciendo notar que las actividades citotóxicas podrían ser las más adecuadas con fines a convertirse en una alternativa dentro de la quimioterapia en un futuro.

Por último y para resaltar las SCAFs **2-14** no poseen propiedades farmacológicas para su administración oral, por lo que se hace necesario explorar otras rutas de administración que permitan alcanzar de una manera dirigida el tejido tumoral afectado.

Los ensayos de citometría de flujo para evaluar el efecto en líneas celulares de CRC después de 8 h de exposición a las SCAF **5, 11 y 13**, en concentraciones correspondientes a CC_{50} y $CC_{50}/2$, mostraron claramente que para la línea celular Detroit 551, el compuesto 5 a 26 μM altera significativamente el ciclo celular de esta población, mientras que SCAF como **11 y 13** no alteran esta línea celular ya que su comportamiento es como el control. En la línea celular SW620 se observó un aumento significativo en la población de fase G1, lo que podría deberse a un desequilibrio en la distribución normal de la población celular respecto al no tratamiento, lo que podría sugerir que hay una parada en la progresión del ciclo celular, acumulando el ADN deteriorado en las líneas celulares de CCR. Este hecho podría sugerir que debido a la inducción de SCAF, los mecanismos de reparación del ADN podrían haberse visto afectados, y por tanto no se permite que la célula pase a la fase siguiente de su ciclo. Sin embargo, otra opción alternativa que se podría tener en cuenta es obtener los cultivos sincronizados esto generaría tal vez un resultado con mayor potencia que permita concluir con mayor facilidad.

Al observar la respuesta de la línea celular SW48, estas células muestran una disminución significativa en la población en la fase G1 sugiriendo fragmentación en el ADN nuclear y muerte celular, lo que podría deberse a un desequilibrio en la distribución poblacional para el control, alterando significativamente el ciclo celular de esta población induciendo su muerte. Por otro lado, en la línea celular SW948 hubo una disminución en la fase G0-G1 y un aumento en la fase sub-G1, sugiriendo nuevamente fragmentación del ADN y muerte celular ya que existe un desequilibrio en la distribución

poblacional. En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con los compuestos 5 y 13 en las dos concentraciones evaluadas alteró significativamente el ciclo celular de las células SW48 CCR, provocando la muerte celular. Por otro lado, no existe diferencia significativa en comparación con el control para el tratamiento con el compuesto 11. Según estudios anteriores se conoce que algunos compuestos catiónicos se unen a la membrana citoplasmática irrumpiendo en ésta y deteriorándola, aumentando la permeabilidad que conlleva a la liberación de componentes citoplasmáticos (Li Zhang et al., 2021).

En general, se observó que la exposición de las células a SCAF 11 y 13 indujo una redistribución de la población celular, aumentando significativamente la población de la fase sub-G1 en relación con la fase diploide G1, incluidas las células Detroit 551, en relación con las células no tratadas. También se observó que si bien existen diferentes estadios dentro del grupo de líneas celulares evaluadas (premetastásico, metastásico localizado y metastásico a distancia), la respuesta a los tratamientos con SCAF es similar para las células SW48 y SW948, lo que sugiere que los compuestos no son selectivo para los diferentes estadios que existen en el CCR, dado que las líneas celulares pertenecen a estadios metastásicos y premetastásicos localizados y que las respuestas a nivel de fragmentación del ADN son similares en estos dos linajes celulares.

Por el contrario, SCAF 5 presenta baja selectividad ya que genera daño en la línea celular control del estudio, induce la disminución de la población en la fase G1, detecta fragmentación del ADN es un compuesto altamente citotóxico incluso para la línea celular Detroit 551, reforzando que éste no sería un buen candidato para una siguiente fase dada su alta toxicidad. En contraste, los compuestos 11 y 13 no generaron un deterioro considerable en las células control en comparación con el CRC en diferentes etapas.

Nuevamente, estos compuestos que poseen grupos trifluorometilo se vuelven esenciales ya que se sabe que el flúor puede mejorar la eficacia de unión y la selectividad de muchos productos farmacéuticos, ya que los sustituyentes que lo poseen prefieren orientarse hacia regiones electropositivas en el sitio receptor debido a la alta electronegatividad de este átomo (Flis et al., 2014). Por otro lado, el grupo trifluorometilo (-CF₃) puede ejercer un profundo efecto sobre los fármacos ya que es capaz de alterar parámetros fisicoquímicos como el efecto estérico, la lipofilidad, el pKa, la

polarización y permitir la formación de puentes de hidrógeno, provocando cambios en parámetros farmacocinéticos como la absorción y el metabolismo (López, 2015; Lopez & Romero, 2011). Estos argumentos podrían estar ganando importancia para explicar por qué la distribución de poblaciones con ADN alterado aumenta cuando se inducen estos compuestos fluorados.

La tinción con PI permite observar el daño de la membrana ya que la capacidad del PI para ingresar a una célula depende de la permeabilidad de la membrana y, a su vez, de su integridad; El PI no tiñe las células que están vivas o en apoptosis temprana debido a la presencia de una membrana plasmática intacta (Ahmed et al., 2013; Lagorce et al., 2017) y <https://www.cellosaurus.org/>, Por el contrario, marca células apoptóticas tardías y necróticas, porque en estos eventos de muerte celular disminuye la integridad de la membrana plasmática y nuclear (Ahmed et al., 2013), lo que permite que el PI atraviese las membranas, se intercale en los ácidos nucleicos y emiten el color rojo fluorescente (Ahmed et al., 2013; Lagorce et al., 2017). Se observó que en las células Detroit 551, la captación de PI estuvo en niveles de control para SCAF **11** y **13**; sugiriendo que este tratamiento no altera significativamente las membranas de las células Detroit 551; sin embargo, el compuesto **5** si generó deterioro en las membranas de estas células.

Debido al gran tamaño de la molécula de PI, no puede atravesar la membrana plasmática a menos que la célula presente una alta permeabilidad que permita atravesar la bicapa e intercalarse entre las dos cadenas de ADN, lo que indica el deterioro celular. Esta permeabilidad podría estar generando la inducción en este caso del compuesto **5**. Sin embargo, al tratar células SW48 con los compuestos **5**, **11** y **13**, respectivamente, se observó un aumento en la captación de PI en general, lo que indica daño a la membrana plasmática; SW48 tiene una clasificación de Duke tipo IV, con metástasis en el colon, y debido a la acción de los prometedores SCAF en esta línea celular indica que podría haber un deterioro de esta población con la inducción de estos compuestos, confirmando el daño a la membrana. de estas células neoplásicas metastásicas.

Para el ensayo en células SW620, sólo el compuesto SCAF 11 generó alteraciones en los niveles de captación de PI; esto sugiere que estas sales podrían estar generando deterioro dependiendo del tipo de línea celular indicando adicionalmente que, quizás las membranas de algunas de ellas (SW620, 48 ó 948), puedan ser más susceptibles a la interacción con alguno de estos compuestos. SW620

pertenece a la clasificación tipo IV de Duke, con metástasis en los ganglios linfáticos mesentéricos, lo que indica que se encuentra distal al colon. Es interesante notar que compuestos como el **11** (C_6ImCF_3), que tiene 6 carbonos en la cadena alifática y tiene grupos CF_3 en posición *meta*, genera daño tan marcado en este linaje celular, en comparación con las otras SCAFs **5** (C_5ClmCF_3), que tiene 5 carbonos sólo en su cadena alifática y tiene los grupos CF_3 ubicados en la posición *para*, y SCAF **13** (C_6ClpCF_3), que tiene 6 carbonos. Además, los sustituyentes CF_3 o trifluorometilo en posición *para*, podrían también estar relacionados con el deterioro observado dependiendo del estadio de la neoplasia. Sin embargo, la línea celular SW948 presentó alteraciones con las tres sales en diferentes concentraciones para el control. Este resultado sugiere, en primer lugar, que estos compuestos son tóxicos en esta línea celular en comparación con el control. SW948 pertenece a la clasificación de Duke tipo C grado III y es un adenocarcinoma colorrectal premetastásico. Es evidente que la acción de los SCAF sobre esta línea celular indica que existe un deterioro de esta población con la inducción de estos compuestos, lo que confirma el daño de la membrana de estas células neoplásicas; sin embargo, nuevamente se destaca la alta afectación que ejerce el SCAF **11** sobre este linaje celular.

Las SCAF **11** y **13** afectan a las células SW48 y SW948, sin embargo, el comportamiento de la línea celular SW620 es particular, aumentando la población de la fase G1 lo que sugiere una acumulación de células que no logran entrar en la fase S, lo que puede conllevar a una muerte celular. Tal vez estas sales pueden hacer que la maquinaria celular se detenga en esta parte del ciclo celular impidiendo que la célula avance hacia la siguiente fase.

Por último, estas sales generan alteraciones en el ciclo celular de las líneas celulares de CCR evaluadas CCR en diferentes etapas. Por lo tanto, evaluar los eventos fisiológicos de la muerte celular y dilucidar los posibles metabolitos y rutas metabólicas a través de los cuales las SCAF generan su acción citotóxica avanzará en la comprensión del mecanismo de acción y apoyará identificación de esta familia de compuestos como alternativa terapéutica para el tratamiento del CCR.

Por otro lado, la detección del cambio en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y la verificación de la viabilidad de las mitocondrias tras la exposición a SCAF mediante tinción con DiOC-6, un colorante lipófilo catiónico que se une a la membrana mitocondrial dada su atracción electroquímica, ya que posee una carga eléctrica negativa, lo que indica que para valores altos de absorción de DiOC-

6 sugiere que las mitocondrias están integradas y son viables. Al realizar los ensayos con DiOC-6 en células de Detroit, es interesante observar que el SCAF 5 presenta poca selectividad ya que genera daño en la línea celular control del estudio Detroit 551. La alteración en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) genera despolarización de esta condición en esta línea celular, mientras que en los tratamientos con moléculas como 11 y 13 no se evidencia ese tipo de deterioro ya que los valores son similares al control no tratado en el caso de la línea celular Detroit 551. Sugiere que el SCAF 5 no es adecuado para continuar como candidato, mientras que los SCAF 11 y 13 son buenos candidatos ya que su comportamiento en las celdas de control es el adecuado.

El ligero aumento en la población de células con la membrana plasmática alterada (Q1) y una ligera disminución en la población de células vivas (Q4), sugiere que la exposición a SCAF 11 y 13 induce daño en la membrana celular.

Luego, los resultados sugieren que SCAF 11 afecta el potencial de membrana de las tres líneas celulares de CCR. Por el contrario, SCAF 5 y 13 afectan el potencial de membrana de las células SW48 (fenotipo metastásico no invasivo) y SW948 (fenotipo premetastásico), pero no el de las células (SW620) con fenotipo metastásico invasivo. El SCAF 5 fue más selectivo a la hora de afectar el potencial de membrana de las células de Detroit que las células CCR.

Las SCAF 5, 11 y 13 son tóxicos para las líneas celulares neoplásicas ya que generan fragmentación del ADN, como se evidencia en el análisis de tinción con yoduro de propidio (PI) dada su capacidad de interaccionar de manera covalente con el ADN. Por otro lado, SCAF 5 no es tan selectivo como SCAF 11 y 13, ya que provocan deterioro en líneas celulares neoplásicas como en la línea celular control, alterando irreversiblemente la membrana plasmática, produciendo fragmentación del ADN y alterando el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) hacia abajo, generando eventos de despolarización de membrana que coinciden con la muerte celular. Esta despolarización impide la unión específica entre DiOC-6 y esa membrana, lo que, junto con la fragmentación del ADN, sugiere que el tipo de muerte inducida por estos compuestos está estrechamente relacionado con la apoptosis aunque no podemos descartar eventos necróticos ya que los análisis lo podrían sugerir también.

Con relación a los hallazgos en metabolómica; es interesante observar como dentro de este listado de rutas enriquecidas por los metabolitos clasificados se encuentran rutas en común para ambos compuestos. Retomando los diagramas de Venn realizados en la sección de resultados, figuras 44, 45 y 46 se observa que solo 2 de las 11 rutas propuestas por el software Metaboanalyst en su versión 6.0 se destacan como rutas que se interceptan para ambos compuestos, vale la pena recordar que estas dos moléculas se diferencian únicamente por la posición *meta* CF₃ en el compuesto **11** o *para* en el CF₃ compuesto **13** en los anillos difenilvinilo de cada una de las sales,

Los resultados sugieren que las diferencias estructurales en estos tipos de SCAF modulan el metabolismo celular de manera diferente, lo que podría traducirse en mecanismos de acción específicos para cada compuesto, una propiedad que además podría ser explotada en desarrollo de terapias antitumorales específicas.

Sin embargo; antes de entrar en detalle sobre las vías metabólicas potencialmente afectadas, es necesario tener en cuenta que los valores de la corrección de Bonferroni y el FDR están podrían indicar que los resultados obtenidos se refieren a la tendencia de que la vía que podría estar mayormente alterada es la de pantotenato y el metabolismo de tirosina, esto debido a que el valor p para la afectación e la via de pantotenato no es nominalmente significativo ($p=0,08$) y los puntajes de afectación en la via son extremadamente cercanos a cero. Es muy probable que las limitaciones de la plataforma al no tener unos modelos multivariados mas flexibles se encuentren valores p tan poco significativos, además los puentes que aun siguen en construcción entre las redes de metabolomica tales como el HMDB y KEGG entre otras, no permiten que toda la info sometida a la plataforma pueda ser analizada y verificada, situación que mejorará una vez continúen los estudios en esta área del conocimiento, tal vez cuando este sistema mejore y además se incluyan plataformas pagadas y otras de uso libre se podrá encontrar mayor cantidad de metabolitos y de vías metabólicas que aporten información a la respuesta celular o del citoplasma con relación a la inducción de las SCAFs para este ensayo las que corresponden a las SCAF **11** y **13**.

Los análisis metabolómicos permitieron identificar dos vias metabólicas afectadas tanto por SCAF **11** como por SCAF **13**: la biosíntesis del pantotenato y CoA y el metabolismo de tirosina, dos rutas metabólicas esenciales para el funcionamiento adecuado de las células y el organismo en general, y

en las que cualquier disfunción puede tener consecuencias graves para la salud y el bienestar. Así por ejemplo, el pantotenato y el CoA son precursores de la coenzima A (CoA), que participa en numerosas reacciones metabólicas, incluida la oxidación de ácidos grasos, la síntesis de esteroides y porfirinas, la biosíntesis de ácidos grasos y la producción de energía a través del ciclo de Krebs. (Halvorsen & Skrede, 1982; Tahiliani & Beinlich, 1991) Por su parte, el metabolismo de la tirosina es esencial para la síntesis de neurotransmisores, hormonas tiroideas y pigmentos de la piel, entre otros compuestos. Además, la tirosina es un precursor importante de las catecolaminas como la dopamina, la adrenalina y la noradrenalina, que desempeñan un papel crucial en la regulación del metabolismo energético, la respuesta al estrés y la función cerebral (Feng et al., 2014; Tahiliani & Beinlich, 1991).

Las vías metabólicas asociadas con el pantotenato, CoA y la tirosina también están involucradas en la regulación del ciclo celular y la señalización celular, específicamente, las vías de señalización de varios receptores de tirosina quinasa, que desempeñan un papel en la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia celular (Matthews, 2007; Taddei et al., 2020). En el CCR, se han observado alteraciones en varias vías metabólicas, incluyendo la biosíntesis del pantotenato y CoA, así como el metabolismo de la tirosina. En condiciones normales, el pantotenato se convierte en CoA a través de una serie de reacciones enzimáticas que implican varias enzimas, como la pantotenato quinasa y la fosfopantotenato-cisteína ligasa. En el CCR, puede estar aumentada la expresión de la pantotenato quinasa y estas alteraciones podrían influir en la disponibilidad de CoA en las células cancerosas y, por lo tanto, afectar su metabolismo lipídico, la síntesis de ácidos grasos y otros procesos metabólicos asociados con la progresión tumoral (Halvorsen & Skrede, 1982)

Algunos autores han reportado que los niveles de pantotenato y CoA están regulados en el cáncer colorrectal (Gold et al., 2022), hallazgo que coincide con lo encontrado en nuestros análisis. Dado que este metabolito se incrementó en el grupo G8, es posible que se genere un aumento o activación de los niveles de pantotenato y, posteriormente, de la Coenzima A (CoA), produciendo un cambio metabólico. Este cambio puede ser significativo tanto en condiciones normales como en situaciones de malignidad y anoxia, donde hay una alta tasa de glucólisis anaeróbica, también conocida como efecto Warburg, común en etapas metastásicas del cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer (Pratt et al., 2021; Tahiliani & Beinlich, 1991). Al incrementarse metabolitos que están bajo regulados en esta situación tales como pantotenato pueda generar efectos adversos a las células cancerosas

impidiendo así su continuidad fisiológica y llevandola a momentos críticos en su metabolismo que generen una cascada de alteraciones en esta condición cancerosa metaplasica alterada y aberrada que conlleven a que la célula continúe hacia la generación de una muerte celular programada o necrótica coincidiendo así con los hallazgos obtenidos en las fase de ensayos de citometría de flujo, donde se evidencio una alteración de potencial de la membrana pasos claves en la señalización de la apoptosis y también algunos eventos necróticos.

Se sabe que el pantotenato es precursor de CoA y tal vez por esta razón al clasificarse como metabolito el pantotenato también lo hace CoA, lo que aumente la cantidad de precursores que están relacionados con la fase aerobica de la oxidación de la glucosa, metabolismo que se ve alterado en CCR debido al incremento del efecto Warburg evento bioquímico en donde la demanda de glicolisis aerobia es disminuida dando paso al incremento en la tasa de glicolisis aerobia debidoo condiciones de crecimiento en anoxia por la falta de vascularización observada en variadas neoplasias, y este switch obligatorio podria estar generando este desbalance que promueva a la célula a morir.

Por otro lado, Qiu et al., (2014) y Baker et al. (1981) revelaron que la pantotenato quinasa 1 (PANK1), responsable de catalizar el primer paso y el que limita la velocidad de la biosíntesis de CoA, presentaba una expresión significativamente mayor en tejidos de cáncer colorrectal. El mayor nivel de cisteína, un sustrato en la síntesis de CoA, observado en muestras de cáncer colorrectal en este estudio sugiere que la síntesis acelerada de CoA desempeña un papel en la morbilidad relacionada con este tipo de cáncer.

Estos hallazgos, junto con el aumento de los niveles de pantotenato después de tratar a las células con el SCAF **13**, sugieren que los niveles citoplasmáticos de pantotenato podrían aumentar aún más. Es muy probable que este incremento inhiba la actividad de enzimas como PANK1 debido a la alta concentración de sustrato, deteniendo la catálisis enzimática y evitando la formación de CoA. Esto podría generar un desgaste celular o estrés metabólico, llevando a la célula a la muerte celular programada (apoptosis) o a otro tipo de muerte celular.

En el panorama metabólico de una célula en condiciones homeostáticas normales, la complejidad es alta; sin embargo, en procesos aberrantes como el cáncer, los vacíos de conocimiento son aún

mayores. Yi et al. (2009) realizaron un estudio en el que encontraron cambios en varias vías metabólicas, incluida la biosíntesis de arginina, el metabolismo de las purinas y la biosíntesis de pantotenato y CoA en pacientes con cáncer colorrectal (CCR). Estos cambios metabólicos son típicos de las células tumorales, que deben adaptarse a un entorno deficiente en nutrientes y obtener los recursos necesarios para favorecer su rápida proliferación y el establecimiento de un nuevo microambiente biológico (Yi et al., 2023).

Esto sugiere que las células en estado metastásico han sufrido diferentes adaptaciones que les han permitido sobrevivir a pesar de la problemática genética, bioquímica y fisiológica de esta etapa del cáncer. Apoya la noción de que si el equilibrio homeostático de estas células es alterado o fracturado químicamente por moléculas que probablemente atraviesan la membrana plasmática, esto podría despolarizar la membrana mitocondrial y elevar los niveles de metabolitos de manera no controlada. Esta alteración afectaría indirectamente varias vías de supervivencia celular, generando un desequilibrio homeostático que conduciría a la muerte celular (Hirayama et al., 2009; Yi et al., 2023).

En este estudio, también se observó que hubo la interrupción de las vías de biosíntesis de pantotenato y CoA en el grupo de CCR. Actualmente, existen muy pocos informes sobre el estado de las vías de biosíntesis de pantotenato y CoA en el cáncer. El pantotenato, también conocido como vitamina B5, es uno de los componentes de la coenzima A. La coenzima A (CoA) desempeña un papel clave en la síntesis de energía y lípidos (Yi et al., 2023). El aumento de la concentración de CoA en el organismo promueve la transición de la oxidación de la glucosa a la oxidación de los ácidos grasos, estimulando así la gluconeogénesis. Estudios recientes han encontrado que las células TC22 en las células T efectoras CD8⁺ expresan en gran medida la vía pantotenato-CoA, y la CoA mejora la capacidad antitumoral de TC22 al promover la fosforilación oxidativa (Yi et al., 2023). Estos resultados sugieren que la alteración de esta vía puede deberse en parte al suministro limitado de energía y a la deficiencia de células T efectoras antitumorales en pacientes con CCR. Estos eventos fueron observados en pacientes que poseen un microambiente tumoral mucho más nutrido que a nivel de cultivo celular

Por otro lado, se ha informado que la enzima tirosina hidroxilasa, que cataliza la conversión de tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA), está sobreexpresada en algunos tumores colorrectales. Estas

alteraciones podrían influir en la síntesis de neurotransmisores y hormonas tiroideas, así como en la producción de melanina en las células cancerosas, lo que potencialmente podría contribuir a la progresión tumoral al influir en el metabolismo celular, la señalización y otros procesos biológicos relevantes para el cáncer. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente el papel específico de estas vías metabólicas en la patogénesis del cáncer colorrectal y su potencial como blancos terapéuticos (Feng et al., 2014; Matthews, 2007).

En resumen, la sobreexpresión y actividad de la pantotenato quinasa, la baja disponibilidad de CoA y la sobreexpresión de la tirosina hidroxilasa podría afectar negativamente las vías metabólicas dependientes de CoA, como la síntesis de ácidos grasos y la generación de energía, lo que a su vez podría influir en la proliferación celular y la supervivencia, ya que las células cancerosas necesitan ácidos grasos para la síntesis de membranas celulares y otras biomoléculas esenciales para el crecimiento tumoral (Pratt et al., 2021). Por su parte, la sobreexpresión de la tirosina hidroxilasa y la alteración en el metabolismo de la tirosina podrían afectar la señalización celular implicadas en la proliferación, la diferenciación y la apoptosis así como también la diferenciación de las células cancerosas y promover la capacidad invasiva y metastásica de las células cancerosas colorrectales. De esta forma, estas dos vías metabólicas podrían constituir blancos terapéuticos (Taddei et al., 2020).

Por último, es importante mencionar la capacidad que tienen estos compuestos tanto SCAF **11** como SCAF **13** para alterar metabolitos en variadas vías bioquímicas que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el arsenal metabólico, tales como, los metabolismos de pirimidinas, taurina e hipotaurina, N-Glicanos, Valina, Leucina e Isoleucina que pertenecen al grupo de los Branched Chain Amino Acid (BCAA) aminoácidos no esenciales y fundamentales para la síntesis y mantenimiento de proteínas, glutatión, ácidos biliares primarios, metabolismo de amino azúcares y azúcares de nucleótido, que regulan procesos de supervivencia celular. Al tener metabolitos intermediarios en estas vías las células de CCR en estadio metastásico no podrían continuar su ciclo de la manera en que lo suelen hacer. Por todo lo anterior las SCAFs podrían ser unos buenos candidatos como alternativa terapéutica en el tratamiento del CCR dado su potencial citotóxico. Tanto SCAF **11** como SCAF **13** afectan estas vías metabólicas sugiriendo entonces que estos compuestos pueden ser considerados como moléculas HIT en el desarrollo de alternativas terapéuticas para el CCR.

9. Conclusiones

9.1 Conclusión general:

Las SCAFs **11** y **13** cumplen con las características para ser consideradas compuestos target en el desarrollo de alternativas terapéuticas debido a que presentan una citotoxicidad acertada, alteran el potencial de membrana mitocondrial, generan detención del ciclo celular y fragmentación del ADN, inducen muerte celular y afectan vías metabólicas relacionadas con la obtención de energía celular, que al parecer si son alteradas podrían estar participando en el proceso de patogénesis del CCR.

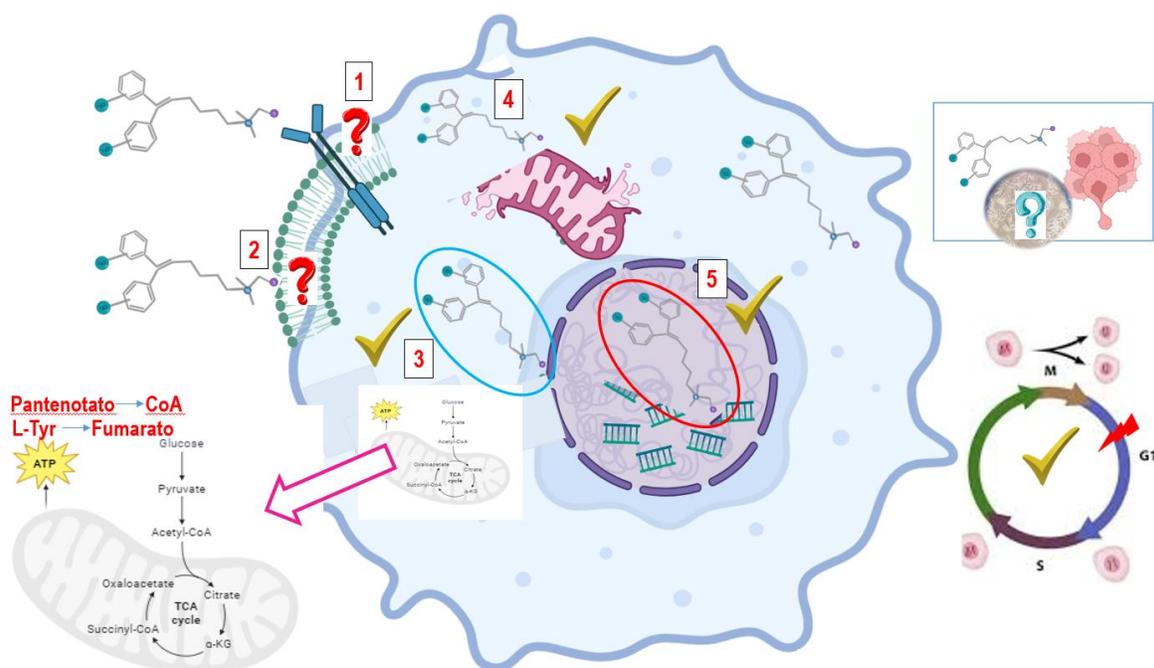


Figura 48. Posible mecanismo de acción citotóxica de las SCAFs 11 y 13 en células SW620 (Ilustración generada con BioRender):

1. No está claro el ingreso de las SCAFs a la célula aún no se conoce si requieren ayuda de una molécula tipo receptor de membrana.
2. Sin embargo reportes indican que muchas sales cuaternarias del mercado tienen interacción directa con las paredes y membranas celulares ingresando directamente al citoplasma sin necesidad de apoyo por alguna proteína transmembranal integral de membrana,

3. Una vez las SCAFs están en el citoplasma podrían desencadenar señales que afecten varias vías metabólicas, así como las de obtención de energía que podrían verse afectadas por la inducción de la biosíntesis de pantoneto y metabolismo de la tirosina, generando desbalance en la tasa de glicolisis anaerobia pasando a una aerobiosis obliogada y dejando de lado el efecto Warburg.
4. Una vez realizado esto y según los resultados obtenidos en los análisis de citometría se pudo observar desbalance en los potenciales de membranas mitocondriales, hechos que deterioran las mitocondriales generando señales de muerte celular posiblemente por apoptosis.
5. Por último se evidenció en los análisis de citometría de flujo en relación a la fragmentación del ADN que la inducción de las SCAFs detienen el ciclo celular en G1 y generan fragmentación del mismo.

9.2 Conclusiones específicas:

Se realizó un estudio en el que se investigó el efecto de las SCAF y SCA no F en líneas celulares de CCR con diferentes contextos genéticos y epigenéticos. El objetivo fue dilucidar los efectos bioquímicos y fisiológicos de dichas sales en las líneas celulares de CCR y establecer correlaciones entre el genotipo y el fenotipo celular asociado a una respuesta diferencial a la quimioterapia. Además, mediante estudios metabólicos, se identificaron potenciales rutas metabólicas objetivo para las SCAF evaluadas, como una aproximación al entendimiento del mecanismo de acción de esta nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del CCR y para la mejora química y potenciación del efecto y la selectividad.

Se encontró que las sales son citotóxicas, dados los resultados obtenidos de manera *in silico* en los análisis de química medicinal, adiconalmente a lo observado en los análisis de citotoxicidad en fibroblastos, sin embrago, demostraron una selectivad para células tumorales en comparación con células no tumorales. Además, dos de las sales evaluadas alteran el potencial de membrana mitocondrial, detienen el ciclo celular y fragmentan el ADN, induciendo muerte por apoptosis y posiblemente necrosis, afectando vías metabólicas relacionadas con la obtención de energía celular. Estas alteraciones podrían estar implicadas en el proceso de patogénesis del CCR.

El trabajo realizado, aunque no es exhaustivo y aún falta ahondar demasiado en el conocimiento, ofrece una amplia gama de hallazgos significativos sobre el potencial terapéutico de las SCAF en el tratamiento del CCR. La citotoxicidad selectiva de las SCAF hacia células tumorales es un hallazgo prometedor, ya que esta selectividad es crucial para minimizar los efectos secundarios no deseados de la quimioterapia convencional, que a menudo afecta a células sanas junto con las cancerosas.

La inducción de apoptosis, la alteración de la permeabilidad de la membrana celular y la detención del ciclo celular en fase subG1 son mecanismos clave de la acción anticancerígena de estas sales. La apoptosis, un proceso natural de muerte celular programada que se suprime en las células cancerosas, puede ser inducida por estas sales, lo que representa una estrategia efectiva para eliminar células tumorales. Detener el ciclo celular es también beneficioso, ya que las células cancerosas suelen dividirse de manera descontrolada.

La alteración de vías metabólicas importantes para la supervivencia celular sugiere que las SCAF **11** y **13** podrían interferir con la capacidad de las células cancerosas para obtener energía y proliferar, debilitando así su capacidad para sobrevivir y crecer.

Identificar correlaciones directas entre el genotipo y el fenotipo asociados con la respuesta diferencial a la quimioterapia es fundamental para la personalización del tratamiento. Esto indica que estas sales podrían ser especialmente efectivas en subgrupos específicos de pacientes con CCR, permitiendo un enfoque más preciso y eficaz en el tratamiento del cáncer.

La información sobre las vías metabólicas objetivo y los mecanismos de acción de estas sales proporciona una base sólida para su mejora química y el diseño de estrategias para aumentar su efecto terapéutico y selectividad. Esto podría incluir la modificación estructural de las sales para mejorar su actividad anticancerígena y reducir los efectos secundarios.

En conclusión, los resultados de este estudio son prometedores y sugieren que las SCAF, especialmente **11** y **13**, tienen un potencial significativo como una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento del CCR. Su capacidad para ser selectivas hacia las células tumorales, inducir

apoptosis, detener el ciclo celular y alterar vías metabólicas clave las convierte en candidatas prometedoras para el desarrollo de tratamientos personalizados y mejorados para el CCR.

10. Perspectivas y Direcciones Futuras del Trabajo

Debido a la limitaciones de este estudio y con el fin de lograr La identificación de correlaciones entre el genotipo y el fenotipo celular sugiere que las SCAF podrían ser utilizadas para desarrollar tratamientos personalizados para subgrupos específicos de pacientes con CCR. Por lo tanto, se sugiere:

- Optimizar la genotipificación y análisis epigenético de las células usadas en este estudio, de manera *in vitro* ya que en este estudio solo se recurrió a lo publicado en los paneles de la ATCC y la pag del IgrhCellID, sin embargo, para próximos estudios, debe hacerse un análisis puntual de genotipificación celular, con el fin de encontrar perfiles genéticos que abarquen un espectro más amplio en mutaciones génicas en estas líneas celulares. El hecho de no haber realizado una genotipificación limita el alcance de los análisis.
- Trabajar en la optimización estructural de las SCAF para aumentar su actividad farmacológica, optimizar o dirigir su actividad anticancerígena y reducir los efectos secundarios asociados a grupos químicos específicos que pueden no estar asociados con los mecanismos antitumorales específicos.
- Avanzar en estudio preclínicos sobre modelos relevantes para la validación de estos hallazgos en modelos de CCR que permitan al final evaluar la eficacia y seguridad de las SCAF en pacientes con CCR.
- Comprender y dilucidar por completo el mecanismo de muerte celular definido en términos de apoptosis, necrosis o cualquier otro tipo de muerte celular.
- Investigar la efectividad de las SCAF en otros tipos de cáncer, lo que podría ampliar su potencial terapéutico, y también realizar ensayo de toxicidad en tumores en todos los estadios de la enfermedad y modelos 3D celulares, así como en organoides.
- Elaborar ensayos con CMSP y PHA alternativamente para verificar si la toxicidad de las SCAFs depende de la proliferación. Así como tomar las células Sub G1 y reexponerlas a las

CC50 de los compuesto con el fin de verificar si evidentemente no hay replicación en ese cultivo. También verificar la posibilidad de combinar las SCAFs con mayor citotoxicidad y generar cocteles de mezclas para ver potencialidad en los resultados, así también evaluar la posibilidad de generar mezclas con 5-FU. Evaluar si hay tolerancia con incrementos de las concentraciones de los compuestos, haciendo ensayos de resistencia.

- Aumentar el impacto del estudio impulsándolo hacia la investigación en clínica tales como el tratamiento directo, propuesta que podría llevar a implementar la medicina personalizada, tratamientos individualizados, que permitan diagnosticar y tratar a cada paciente según su propio perfil de malignidad de la neoplasia que esta cursando, iniciar la búsqueda de biomarcadores y dependiendo de estos tener la alternativa de iniciar esquemas de respuesta con el fin de buscar la solución al problema, disminuyendo los efectos adversos por tratamientos generalizados y aumentando la expectativa de vida y bienestar del paciente con tratamientos dirigidos y posiblemente menos invasivos. Complementar los estudios metabolómicos para células de CCR SW948 con el ánimo de hacer estudios dirigidos sobre las rutas metabólicas moduladas por acción de las SCAF que permitan un mejor acercamiento a los mecanismos de acción y las rutas metabólicas complementarias o accesorias que están involucradas en la respuestas a este grupo de compuestos.
- Continuar con estudios metabolómicos de las demás líneas celulares SW48 y Detroit 551 y otros análisis moleculares sobre líneas celulares que sirvan de control específico para las líneas de CCR estudiadas, conservando origen y en ausencia de los grupo de mutaciones descritos de tal modo que se puedan verificar las hipótesis de asociación entre los tratamiento y el contexto genético y de esta manera ampliar el entendimiento de los mecanismos de acción de las SCAF y cómo afectan las vías metabólicas en las células cancerosas, incrementando la cantidad de vías que pueden estar afectadas bajo la inducción de estos compuestos en este modelo de citotoxicidad.

11. Bibliografía

- Afanador Ayala, C. H., & Muñetón Peña, C. M. (2018). Epigenética del cáncer colorrectal. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 33(1), 32. <https://doi.org/10.22516/25007440.229>
- Afanador, C. H., Palacio, K. A., Isaza, L. F., Ahumada, E., Ocampo, C. M., & Muñetón, C. M. (2022). Molecular characterization of colorectal cancer patients. *Biomedica*, 42, 154–171. <https://doi.org/10.7705/biomedica.5957>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G. E., & Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, 2(0424), e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Akhoondi, S., Sun, D., Von Der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., Cepeda, D., Fiegl, H., Dofou, D., Marth, C., Mueller-Holzner, E., Corcoran, M., Dagnell, M., Nejad, S. Z., Nayer, B. N., Zali, M. R., Hansson, J., Egyhazi, S., Petersson, F., ... Spruck, C. (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Research*, 67(19), 9006–9012. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1320>
- Benson, A. B., Venook, A. P., Mahmoud, M., Al-Hawary, Nelson, R. L. (2023). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Seminars in Surgical Oncology*, 10(3). <https://doi.org/10.1002/ssu.2980100302>
- Aldecoa, F., & Ávila, J. (2021). La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. *Horizonte Médico (Lima)*, 21(4), e1547
- Aldecoa, F. (2020). Supervivencia global del cáncer colorrectal metastásico en Lima Metropolitana: relación con el estado mutacional del gen KRAS. *Acta Medica Peruana*, 37(2), 122–129. <https://doi.org/10.35663/amp.2020.372.868>
- Amin, M. B., Frederick, ;, Greene, L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., David, ;, Byrd, R., & Winchester, P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to Build a Bridge From a Population-Based to a More “Personalized” Approach to Cancer Staging. *American Cancer Society ACS*, 67(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Anighoro, A., Bajorath, J., & Rastelli, G. (2014). Polypharmacology : Challenges and Opportunities in Drug Discovery Department of Life Science Informatics , B-IT , LIMES Program Unit Chemical Biology and Medicinal. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 7874–7887.

- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research*, 5(1), 19–27.
- Asante Ia,*, Chui Da, Pei Ha, Zhou Ea, De Giovanni Cb, Conti Dc, and L. S. (2019). Alterations in Folate-dependent One-Carbon Metabolism as Colon Cell Transition from Normal to Cancerous. *J Nutr Biochem*, 176(69), 1–9. <https://doi.org/doi:10.1016/j.jnutbio.2019.02.008>.
- Billiau, A. (2016). Colorectal Cancer: a Guide for Patients. *European Society for Medical Oncology*. <http://www.esmo.org/content/download/15729/270768/file/ESMO-ACF-EN-Colorectal-Cancer-Guide-for-Patients.pdf>
- Boumann, H. A., Damen, M. J. A., Versluis, C., Heck, A. J. R., de Kruijff, B., & de Kroon, A. I. P. M. (2003). The Two Biosynthetic Routes Leading to Phosphatidylcholine in Yeast Produce Different Sets of Molecular Species. Evidence for Lipid Remodeling †. *Biochemistry*, 42(10), 3054–3059. <https://doi.org/10.1021/bi026801r>
- Bravo, L. E., & Muñoz, N. (2018). Epidemiology of cancer in Colombia. *Colombia Medica*, 49(1), 09–12. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3877>
- Burt, R. (2007). Inheritance of colorectal cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4(4), 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2008.05.004>
- Cabrera, C. M., & López-Nevot, M. A. (2005). APC and chromosome instability in colorectal cancer. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 97(10), 738–741. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082005001000006>
- Calas, M., Cordina, G., Bompard, J., Bari, M. Ben, Jei, T., Ancelin, M. L., & Vial, H. (1997). Antimalarial activity of molecules interfering with Plasmodium falciparum phospholipid metabolism. Structure-activity relationship analysis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(22), 3557–3566. <https://doi.org/10.1021/jm9701886>
- Calvani, M., Critelli, L., Gallo, G., Giorgi, F., Gramiccioli, G., Santaniello, M., Scafetta, N., Tinti, M. O., & De Angelis, F. (1998). L-carnitine esters as “soft”, broad-spectrum antimicrobial amphiphiles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(13), 2227–2233. <https://doi.org/10.1021/jm970305x>
- Calvo-Alvarez, J., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2021). Vitamin e TPGS 1000 Induces Apoptosis in the K562 Cell Line: Implications for Chronic Myeloid Leukemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5580288>
- Cancer; world health organizer; international agency for research on cancer. (2018). *Latest global cancer data: cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in*

2018. <http://gco.iarc.fr/>,
- Charles, H., K., Chaudhuri N., Peter, D., Dorothy, M., & Griesbach. (1957). Flourinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Group Nature Publishing*, 180, 756–757.
- Clarens, D. C. (2004). *Molecular genetics of cancer colorectal*. 96(537), 48–59.
- Cordero-pérez, P., Sánchez-martínez, C., García-hernández, P. A., & Saucedo, L. (2020). Metabolómica de la nefropatía diabética : tras la huella de indicadores de desarrollo y progresión. *NEFROLOGÍA*, 40(6), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2020.07.002>
- Díaz-Vegas, A., Sánchez-Aguilera, P., Krycer, J. R., Morales, P. E., Monsalves-Alvarez, M., Cifuentes, M., Rothermel, B. A., And, & Lavandero, S. (2020). Is mitochondrial dysfunction a common root of non-communicable diseases. *Cadernos de Saúde Pública*, 41(3):bnaa005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.09.005><http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.060>
- Ding, J., Ji, J., Rabow, Z., Shen, T., Folz, J., Brydges, C. R., Fan, S., Lu, X., Mehta, S., Showalter, M. R., Zhang, Y., Araiza, R., Bower, L. R., Lloyd, K. C. K., & Fiehn, O. (2021). A metabolome atlas of the aging mouse brain. *Nature Communications*, 12(1): 6021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26310-y>
- Duque-Benítez, S. M., Amalia Ríos-Vásquez, L., Ocampo-Cardona, R., Cedeño, D. L., Jones, M. A., Vélez, I. D., & Robledo, S. M. (2016). Synthesis of Novel Quaternary Ammonium Salts and Their in Vitro Antileishmanial Activity and U-937 Cell Cytotoxicity. *Molecules*, 21(4):381. <https://doi.org/10.3390/molecules21040381>
- Egorova, K. S., Gordeev, E. G., & Ananikov, V. P. (2017). Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chemical Reviews*, 117(10), 7132–7189. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00562>
- Egorova, K. S., Seitzkalieva, M. M., Posvyatenko, A. V., Khrustalev, V. N., & Ananikov, V. P. (2015). Cytotoxic Activity of Salicylic Acid-Containing Drug Models with Ionic and Covalent Binding. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 6(11), 1099–1104. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00258>
- Ensunchó, A. E., Robles, J. R., & Figueredo, S. F. (2017). Modelado de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de los derivados 5-(nitroheteroaril)-1,3,4-tiadiazol con actividad leishmanicida. *Informacion Tecnológica*, 28(2), 191–202. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200020>

- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990a). A genetic model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, *61*, 759–767.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990b). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Feng, L., He, Y. Q., Xu, G. H., Hu, H., Guo, L., & Wan, Y. Q. (2014). Determination of Tyrosine and Its Metabolites in Human Serum with Application to Cancer Diagnosis. *Analytical Letters*, *47*(8), 1275–1289. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.871549>
- Fernandes, J., & Gattass, C. R. (2009). Topological polar surface area defines substrate transport by multidrug resistance associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Journal of Medicinal Chemistry*, *52*(4), 1214–1218. <https://doi.org/10.1021/jm801389m>
- Fernandez, M., Murillo, J., Ríos-Vásquez, L. A., Ocampo-Cardona, R., Cedeño, D. L., Jones, M. A., Velez, I. D., & Robledo, S. M. (2018). In vivo studies of the effectiveness of novel N-halomethylated and non-halomethylated quaternary ammonium salts in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Parasitology Research*, *117*(1), 273–286. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5702-9>
- Fiehn, O., Wohlgemuth, G., Scholz, M., Kind, T., Lee, D. Y., Lu, Y., Moon, S., & Nikolau, B. (2008). Quality control for plant metabolomics: Reporting MSI-compliant studies. *Plant Journal*, *53*(4), 691–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03387.x>
- Flatin, B. T. B., Vedeld, H. M., Pinto, R., Langerud, J., Lind, G. E., Lothe, R. A., Sveen, A., & Jeanmougin, M. (2021). Multiregional assessment of CIMP in primary colorectal cancers: Phenotype concordance but marker variability. *International Journal of Cancer*, *148*(7), 1652–1657. <https://doi.org/10.1002/ijc.33425>
- Flis, S., Gnyszka, A., & Flis, K. (2014). DNA methyltransferase inhibitors improve the effect of chemotherapeutic agents in SW48 and HT-29 colorectal cancer cells. *PLoS ONE*, *9*(3), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092305>
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H., & Clevers, H. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nature Cell Biology*, *3*(4), 433–438. <https://doi.org/10.1038/35070129>
- Gastaud, J. M., Senelar, R., & Pujol, H. (1998). Effet D'Ammonium Quaternaire Halogene Sur Des Cultures De Cellules Tumorales. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences - Serie III*,

- 321(1), 5–10. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(97\)89619-9](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(97)89619-9)
- GiamPaolo Tortora, Cristina Sessa, L. B. (2017). *Esmo Glossary in Molecular Biology of Cancer and Molecular Techniques* (E. S. for M. O. Medical (Ed.); 2015th ed.). ESMO.
- Giraud, I., Rapp, M., Maurizis, J. C., & Madelmont, J. C. (2002). Synthesis and in vitro evaluation of quaternary ammonium derivatives of chlorambucil and melphalan, anticancer drugs designed for the chemotherapy of chondrosarcoma. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(10), 2116–2119. <https://doi.org/10.1021/jm010926x>
- Goel, A., & Boland, C. R. (2012). Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 143(6), 1442–1460.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.032>
- Gold, A., Choueiry, F., Jin, N., Mo, X., & Zhu, J. (2022). The Application of Metabolomics in Recent Colorectal Cancer Studies: A State-of-the-Art Review. *Cancers*, 14(3), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cancers14030725>
- Goyle, S., & Maraveyas, A. (2006). Chemotherapy for colorectal cancer. *Digestive Surgery*, 22(6), 401–414. <https://doi.org/10.1159/000091441>
- Gozalbes, R., & Vicente de Julián-Ortiz, J. (2018). Applications of Chemoinformatics in Predictive Toxicology for Regulatory Purposes, Especially in the Context of the EU REACH Legislation. *International Journal of Quantitative Structure-Property Relationships*, 3(1), 1–24. <https://doi.org/10.4018/ijqspr.2018010101>
- HALVORSEN, O., & SKREDE, S. (1982). Regulation of the Biosynthesis of CoA at the Level of Pantothenate Kinase. *European Journal of Biochemistry*, 124(1), 211–215. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05927.x>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674).
- Hendon, S. E., & DiPalma, J. A. (2005). U.S. practices for colon cancer screening. In *Keio Journal of Medicine*, 54(4), 179–183. <https://doi.org/10.2302/kjm.54.179>
- Hudler, P. (2012). Genetic Aspects of Gastric Cancer Instability. *The Scientific World Journal*, 2012, 1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/761909>
- Inamura, K. (2018). Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.3390/cancers10010026>
- Indrayanto G, Putra GS, Suhud F. Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2021;46:273-307. doi:

- 10.1016/bs.podrm.2020.07.005. Epub 2020 Aug 27. PMID: 33461699.
- Isanbor, C., & O'Hagan, D. (2006). Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *Journal of Fluorine Chemistry*, 127(3), 303–319. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2006.01.011>
- Ito, E., Yip, K. W., Katz, D., Fonseca, S. B., Hedley, D. W., Chow, S., Xu, G. W., Wood, T. E., Bastianutto, C., Schimmer, A. D., Kelley, S. O., & Liu, F. F. (2009). Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anticancer agent for head and neck cancer. *Molecular Pharmacology*, 76(5), 969–983. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055277>
- Jain, Z. J., Gide, P. S., & Kankate, R. S. (2017). Biphenyls and their derivatives as synthetically and pharmacologically important aromatic structural moieties. In *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S2051–S2066. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.07.035>
- Jass, J. R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, 50(1), 113–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>
- Karczmariski, J., Goryca, K., Pachlewski, J., Dabrowska, M., Pysniak, K., Paziewska, A., Kulecka, M., Lenarcik, M., Mroz, A., Mikula, M., & Ostrowski, J. (2019). Mutation Profiling of Premalignant Colorectal Neoplasia. *Gastroenterology Research and Practice*, 2019, 2542640. <https://doi.org/10.1155/2019/2542640>
- Kawashita, Y., Morine, Y., Ikemoto, T., Saito, Y., Iwahashi, S., Yamada, S., Higashijima, J., Imura, S., Ogawa, H., Yagi, T., & Shimada, M. (2017). Loss of Fbxw7 expression is a predictor of recurrence in colorectal liver metastasis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 24(10), 576–583. <https://doi.org/10.1002/jhbp.500>
- Komatsu, Y., Yoshitomi, T., Furuya, K., Ikeda, T., Terasaki, A., Hoshi, A., Kawazoe, N., Chen, G., & Matsui, H. (2022). Long-Term Fluorescent Tissue Marking Using Tissue-Adhesive Porphyrin with Polycations Consisting of Quaternary Ammonium Salt Groups. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4218. <https://doi.org/10.3390/ijms23084218>
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., Van Wichen, D., De Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Clevers, H. (1997). Constitutive transcriptional activation by a β -catenin-Tcf complex in APC(-/-) colon carcinoma. In *Science*, 275(5307), 1784–1787. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1784>
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3. doi: 10.1073/pnas.68.4.820. PMID: 5279523; PMCID: PMC389051.

- Labianca, R., Nordlinger, B., Beretta, G. D., Mosconi, S., Mandalà, M., Cervantes, A., & Arnold, D. (2013). Early colon cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *24*(S6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt354>
- Lagorce, D., Douguet, D., Miteva, M. A., & Villoutreix, B. O. (2017a). Computational analysis of calculated physicochemical and ADMET properties of protein-protein interaction inhibitors. *Scientific Reports*, *7*, 46277. <https://doi.org/10.1038/srep46277>
- Leong, S. R., Liang, W. C., Wu, Y., Crocker, L., Cheng, E., Sampath, D., Ohri, R., Raab, H., Hass, P. E., Pham, T., Firestein, R., Li, D., Schutten, M., Stagg, N. J., Ogasawara, A., Koppada, N., Roth, L., Williams, S. P., Lee, B. C., ... Polson, A. G. (2015). An Anti-B7-H4 antibody-drug conjugate for the treatment of breast cancer. *Molecular Pharmaceutics*, *12*(6), 1717–1729. <https://doi.org/10.1021/mp5007745>
- Li, D. (2018). Recent advances in colorectal cancer screening. *Chronic Diseases and Translational Medicine*, *4*(3), 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2018.08.004>
- Li, L., Pan, Q., Sun, M., Lu, Q., & Hu, X. (2007). Dibenzocyclooctadiene lignans - A class of novel inhibitors of multidrug resistance-associated protein 1. *Life Sciences*, *80*(8), 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.002>
- Li, X. L., Zhou, J., Chen, Z. R., & Chng, W. J. (2015). P53 mutations in colorectal cancer- Molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(1), 84–93. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i1.84>
- Li, Z., & Vance, D. E. (2008). Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of Lipid Research*, *49*(6), 1187–1194. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700019-JLR200>
- Liu, Y., Chen, H., Bao, H., Zhang, J., Wu, R., & Zhu, L. (2023). Comprehensive characterization of FBXW7 mutational and clinicopathological profiles in human colorectal cancers. *Frontiers in Oncology*, *13*:1154432. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1154432>
- Liu, Z., Zhang, Y., Dang, Q., Wu, K., Jiao, D., Li, Z., Sun, Z., & Han, X. (2021). Genomic Alteration Characterization in Colorectal Cancer Identifies a Prognostic and Metastasis Biomarker: FAM83A|IDO1. *Frontiers in Oncology*, *11*:632430. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.632430>
- López-Muñoz, M., Gomez-Peña, J. J., Ríos-Vásquez, L. A., Ocampo-Cardona, R., Jones, M. A., Haynes, C. S., Wallace, C., & Robledo, S. M. (2019). Novel fluorinated quaternary ammonium salts and their in vitro activity as trypanocidal agents. *Medicinal Chemistry Research*, *28*(3), 300–319. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-02285-2>

- López, S. (2015). Grupo pentafluorosulfanilo (-SF5): ¿un nuevo bioisómero del grupo trifluorometilo (-CF3)? *Revista de La Facultad de Farmacia*, 77(1y2), 54–64.
- Lopez, S. E., & Romero, Á. (2011). Grupo trifluorometilo: un sustituyente importante en química medicinal. *Revista Facultad de Farmacia*, 74(2), 40–52.
<https://www.researchgate.net/publication/235339441>
- Lynch, H. T., Snyder, C. L., Shaw, T. G., Heinen, C. D., & Hitchins, M. P. (2015). Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015. *Nature Reviews Cancer*, 15(3), 181–194.
<https://doi.org/10.1038/nrc3878>
- Marco-Ramell, A., Palau-Rodriguez, M., Alay, A., Tulipani, S., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Pla, A., & Andres-Lacueva, C. (2018). Evaluation and comparison of bioinformatic tools for the enrichment analysis of metabolomics data. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1186/s12859-017-2006-0>
- Maritza, F., Luz Amalia, R.-V., Rogelio, O.-C., Oscar, F., David L, C., Teresa M, G., Antonio J, A., Iván D, V., & Sara M, R. (2018). Physicochemical and Biopharmaceutical Characterization of N-Iodomethyl-N,N-Dimethyl-N-(6,6-1 Diphenylhex-5-En-1-Yl) Ammonium Iodide and A Promising Antileishmania Delivery System. *International Archives of Medical Microbiology*, 1(1), 1–14.
<https://doi.org/10.23937/iamm-2017/1710007>
- Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(25), 2449–2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Mary Ruth Brome Bohórquez, Diego Mauricio Montoya Restrepo, & Liseth Amell Salcedo. (2018). Incidencia y mortalidad por cáncer en Medellín, Colombia. 2010-2014. *Colombia Médica*, 49(1), 81–88. <https://doi.org/10.25100/cm.v49i1.3740>
- Matthews, D. E. (2007). An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *Journal of Nutrition*, 137(6). <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1549s>
- Mavromoustakos, T., Calogeropoulou, T., Koufaki, M., Kolocouris, A., Daliani, I., Demetzos, C., Meng, Z., Makriyannis, A., Balzarini, J., & Clercq, E. De. (2001). Ether Phospholipid-AZT Conjugates Possessing Anti-HIV and Antitumor Cell Activity. Synthesis, Conformational Analysis, and Study of Their Thermal Effects on Membrane Bilayers. *Journal of Medicinal*

- Chemistry*, 44(11), 1702–1709. <https://doi.org/10.1021/jm001121c>
<https://doi.org/10.1155/2011/792362>
- Migliore, L., Migheli, F., Spisni, R., & Coppedè, F. (2011b). Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 792362.
<https://doi.org/10.1155/2011/792362>
- Vacas, M. (n.d.). Síndrome de Lynch, qué es y su relación con el cáncer colorrectal. Retrieved May 1, 2019, from <https://www.webconsultas.com/salud-al-dia/sindrome-de-lynch/que-es-el-sindrome-de-lynch>
- Mitsudomi, T. (2010). Advances in target therapy for lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 40(2), 101–106. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyp174>
- Múnera-Orozco, C., Ocampo-Cardona, R., Cedeño, D. L., Toscano, R. A., & Ríos-Vásquez, L. A. (2015). Crystal structures of three new N-halomethylated quaternary ammonium salts. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications*, 71, 1230–1235.
<https://doi.org/10.1107/S2056989015017181>
- Muñeton Peña Carlos Mario. (2008). Describen las bases genéticas de la carcinogénesis del cáncer colorrectal. *Sociedad Iberoamericana de Informacion Científica*.
<https://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/96981>
- Mohapatra S, Yutao L, Goh SG, Ng C, Luhua Y, Tran NH, Gin KY. Quaternary ammonium compounds of emerging concern: Classification, occurrence, fate, toxicity and antimicrobial resistance. *J Hazard Mater*. 2023 Mar 5;445:130393. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130393. Epub 2022 Nov 15. PMID: 36455328; PMCID: PMC9663149.
- Ng, C. K. L., Obando, D., Widmer, F., Wright, L. C., Sorrell, T. C., & Jolliffe, K. A. (2006). Correlation of antifungal activity with fungal phospholipase inhibition using a series of bisquaternary ammonium salts. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(2), 811–816.
<https://doi.org/10.1021/jm0508843>
- Nguyen, H., Duong, H., Duong, H., & Duong, H. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters*, 16(1), 9–18.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>
- Nguyen, M. T., & Weinberg, D. S. (2016). Biomarkers in Colorectal Cancer Screening. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 14(8), 1033–1040.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27496118>

- Nicholson, J. K. (2004). Metabonomics a generic platform for the investigation of drug toxicity , altered gene function and disease processes. *Drug Discovery World Summer*, 23–28.
- Obląg, E., Piecuch, A., Maciaszczyk-Dziubińska, E., & Wawrzycka, D. (2016). Quaternary ammonium salt N-(dodecyloxycarbonylmethyl)-N,N,N-trimethyl ammonium chloride induced alterations in *Saccharomyces cerevisiae* physiology. *Journal of Biosciences*, 41(4), 601–614.
<https://doi.org/10.1007/s12038-016-9644-7>
- Omran, Z., Guise, C. P., Chen, L., Rauch, C., Abdalla, A. N., Abdullah, O., Sindi, I. A., Fischer, P. M., Smail, J. B., Patterson, A. V., Liu, Y., & Wang, Q. (2021). Design, synthesis and in-vitro biological evaluation of antofine and tylophorine prodrugs as hypoxia-targeted anticancer agents. *Molecules*, 26(11). <https://doi.org/10.3390/molecules26113327>
- Organization, I.-W.-W. H. (2022). *Globocan-Colorectal cancer incidence in the world* (p. 419).
- Pardo, C., & Cendales, R. (2015). Cáncer en Colombia 2007-2011. In *Instituto Nacional de Cancerología-ESE Colombia*. www.cancer.gov.co
- Pavicic, W., Nieminen, T. T., Gylling, A., Pursiheimo, J.-P., Laiho, A., Gyenesei, A., Järvinen, H. J., & Peltomäki, P. (2014). Promoter-specific alterations of *APC* are a rare cause for mutation-negative familial adenomatous polyposis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(10), 857–864.
<https://doi.org/10.1002/gcc.22197>
- Pereiro, A. B., Araújo, J. M. M., Martinho, S., Alves, F., Nunes, S., Matias, A., Duarte, C. M. M., Rebelo, L. P. N., & Marrucho, I. M. (2013). Fluorinated ionic liquids: Properties and applications. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1(4), 427–439. <https://doi.org/10.1021/sc300163n>
- Pratt, M., Forbes, J. D., Knox, N. C., Bernstein, C. N., & Van Domselaar, G. (2021). Microbiome-Mediated Immune Signaling in Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: Support From Meta-omics Data. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9: 716604.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.716604>
- Richardson, P. G., Eng, C., Kolesar, J., Hideshima, T., & Anderson, K. C. (2012). Perifosine, an oral, anti-cancer agent and inhibitor of the Akt pathway: Mechanistic actions, pharmacodynamics, pharmacokinetics, and clinical activity. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 8(5), 623–633. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.681376>
- Ríos, L. A., Ocampo, R., Duque, S. M., Robledo, S.M., Vélez, I. D., Cedeño, D. L., Jones, M. A. (2015). "Quaternary N-(Halomethyl) Ammonium Salts as Therapeutic Agents" Patent US

9145352 B2, 29 September. 2(Patent US 9145352 B2).

<https://patents.google.com/patent/US9145352B2/en?q=9%2C145%2C352%0Ahttps://patents.google.com/patent/US9145352B2/en>

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., & Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes and Cancer*, 2(4), 466–474. <https://doi.org/10.1177/1947601911408889>

Roche, Victoria F., editor.; Zito, S. William, editor.; Lemke, Thomas L., editor.; Williams, David A., 1938- editor. Foye's principles of medicine chemistry. Wolters Kluwer; 2020

Rúa, K. A. P., & Peña, C. M. M. (2012). Bases moleculares del cáncer colorrectal. *Iatreia*, 25(2), 137–148.

Seguí, N., Guinó, E., Pineda, M., Navarro, M., Bellido, F., Lázaro, C., Blanco, I., Moreno, V., Capellá, G., & Valle, L. (2014). Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 9(2), e86063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086063>

Serrano, J. L., Maia, A., Santos, A. O., Lima, E., Reis, L. V., Nunes, M. J., Boto, R. E. F., Silvestre, S., & Almeida, P. (2022). An Insight into Symmetrical Cyanine Dyes as Promising Selective Antiproliferative Agents in Caco-2 Colorectal Cancer Cells. *Molecules*, 27(18). <https://doi.org/10.3390/molecules27185779>

Shao, J., Zhang, F., Bai, Z., Wang, C., Yuan, Y., & Wang, W. (2012). Synthesis and antitumor activity of emodin quaternary ammonium salt derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.07.047>

Shiraishi, M., Aramaki, Y., Seto, M., Imoto, H., Nishikawa, Y., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Nishimura, O., Baba, M., & Fujino, M. (2000). Discovery of novel, potent, and selective small-molecule CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(10), 2049–2063. <https://doi.org/10.1021/jm9906264>

Smit, W. L., Spaan, C. N., De Boer, R. J., Ramesh, P., Garcia, T. M., Meijer, B. J., Vermeulen, J. L. M., Lezzerini, M., MacInnes, A. W., Koster, J., Medema, J. P., Van Den Brink, G. R., Muncan, V., & Heijmans, J. (2020). Driver mutations of the adenoma-carcinoma sequence govern the intestinal epithelial global translational capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25560–25570.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1912772117>

- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2007). Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell*, 12(4), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.001>
- Taddei, M. L., Pardella, E., Pranzini, E., Raugei, G., & Paoli, P. (2020). Role of tyrosine phosphorylation in modulating cancer cell metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1874(2), 188442. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188442>
- Tahiliani, A. G., & Beinlich, C. J. (1991). Pantothenic Acid in Health and Disease. *Vitamins and Hormones*, 46(C), 165–228. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60684-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60684-6)
- The Global Cancer Observatory. (2021). Colombia: GLOBOCAN 2020. *International Agency for Research on Cancer*, 509, 1–2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
- Thévenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., & Junot, C. (2015). Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *Journal of Proteome Research*, 14(8), 3322–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>
- Tomasz, A., & Borek, E. (1959). an Early Phase in the Bactericidal Action of 5-Fluorouracil on E. Coli K 12 . Osmotic Imbalance . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 45(7), 929–932. <https://doi.org/10.1073/pnas.45.7.929>
- Upegui, Y. A., Echeverri, F., Quiñones, W., Torres, F., Nacher, M., Rivas, L. I., Meira, C. dos S., Gedamu, L., Escobar, G., Archbold, R., Vélez, I. D., & Robledo, S. M. (2020). Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 13(June), 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.06.004>
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Smits, A. M. M., & Bos, J. L. (1988). Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Sander, C., Stuart, J. M., Chang, K., Creighton, C. J., Davis, C., Donehower, L., Drummond, J., Wheeler, D., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y. S. N., Chu, A., ... Kling, T. (2013). The cancer genome atlas pan-cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113–1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>

- What Is Cancer? - NCI.* (n.d.). Retrieved April 2, 2023, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Williams, David A. Lemke, Thomas L. Roche, Victoria G. Zito, W. S. (2013). *Foye's principles of medicinal chemistry* (lippincott (Ed.); 7th ed.).
- Wolf, A. M. D., Fontham, E. T. H., Church, T. R., Flowers, C. R., Guerra, C. E., LaMonte, S. J., Etzioni, R., McKenna, M. T., Oeffinger, K. C., Shih, Y.-C. T., Walter, L. C., Andrews, K. S., Brawley, O. W., Brooks, D., Fedewa, S. A., Manassaram-Baptiste, D., Siegel, R. L., Wender, R. C., & Smith, R. A. (2018). Colorectal cancer screening for average-risk adults: 2018 guideline update from the American Cancer Society. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.21457>
- Yang, J. S., Song, D., Ko, W. J., Kim, B., Kim, B.-K., Park, S.-K., Won, M., Lee, K., Lee, K., Kim, H. M., & Han, G. (2013). Synthesis and biological evaluation of novel aliphatic amido-quaternary ammonium salts for anticancer chemotherapy: Part II. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *63*, 621–628. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.12.063>
- Yang, J. S., Song, D., Lee, B., Ko, W. J., Park, S.-K., Won, M., Lee, K., Kim, H. M., & Han, G. (2011). Synthesis and biological evaluation of novel aliphatic amido-quaternary ammonium salts for anticancer chemotherapy: Part I. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(7), 2861–2866. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.04.009>
- Yi, Y., Wang, J., Liang, C., Ren, C., Lian, X., Han, C., & Sun, W. (2023). LC–MS-based serum metabolomics analysis for the screening and monitoring of colorectal cancer. *Frontiers in Oncology*, *13*:1173424. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1173424>
- Yip, K. W., Mao, X., Au, P. Y. B., Hedley, D. W., Chow, S., Dalili, S., Mocanu, J. D., Bastianutto, C., Schimmer, A., & Liu, F.-F. (2006). Benzethonium Chloride: A Novel Anticancer Agent Identified by Using a Cell-Based Small-Molecule Screen. *Clinical Cancer Research*, *12*(18), 5557–5569. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0536>
- Zhang, B., Halder, S. K., Kashikar, N. D., Cho, Y., Datta, A., David, L., & Datta, P. K. (2011). *Anti-metastatic Role of Smad4 Signaling in Colorectal cancer*. *138*(3), 969–980. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.11.004>.Anti-metastatic
- Zhang, Li, Feng, X. Z., Xiao, Z. Q., Fan, G. R., Chen, S. X., Liao, S. L., Luo, H., & Wang, Z. De. (2021). Design, synthesis, antibacterial, antifungal and anticancer evaluations of novel β -pinene quaternary ammonium salts. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20).

<https://doi.org/10.3390/ijms222011299>

Zhang, Lu, & Shay, J. W. (2017). Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(8), 1–10.

<https://doi.org/10.1093/jnci/djw332>

https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL/

falomir Lockhart, Lisandro J. Franchini Gisela Raquel scaglia scaglia Natalia (PDF) Capítulo 10 Técnicas Biofísicas para el Estudio de Lípidos y Membranas. 2017.

Anexo 1. Pruebas piloto: estandarización de condiciones óptimas para los análisis metabolómicos definitivos

Cultivo y tratamiento de las células SW620

Las líneas celulares SW620 se sembraron a una densidad de $1,8 \times 10^6$ en platos de cultivo de 5 cm de diámetro recubiertas con poli-lisina para mayor adherencia, se adicionó medio Leibovitz's-15 (L-15) al 10% (Caison), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco NY,USA), L-Glutamina (L-Glu) al 1% (Caison) y penicilina-estreptomicina al 1% a 37°C, sin flujo de CO₂.

Para el primer ensayo piloto se implementó la estrategia de lavar con NaCl al 1% o no lavar las monocapas de las células SW620 una vez se haya retirado el medio de cultivo antes de ponerlas en cama de hielo y generar los quenching (Yusof et al.; 2019, Scoazec et al., 2011).

Pasadas 15 horas de haber generado el cultivo celular se procedió al retiro de 5 mL del medio de cultivo completo y se lavaron las monocapas de tres platos de cultivo (G4, G5 y G6) con NaCl al 1% solución previamente autoclavada y esterilizada, y en otros tres platos (G1, G2 Y G3) solo se hizo el respectivo retiro de medio de cultivo y de inmediato se realizaron lo pasos para la obtención de metabolitos que consistió en; posar en cama de hielo seco los platos, rápidamente se adiciono a todas las 6 cajas la solución de extracción de metabolitos pre-enfriada a -20°C compuesta por Metanol (ME-OH) 80%, agua H₂O miliQ 20% y como estándar interno Aldonitol o Ribitol, (sigma-life science #cas 488-81-3), en una concentración de 10 µg/mL, seguidamente se retiraron las monocapas con ayuda de cell scrapers o policías, se tomaron con una micropipeta de 1000 µL y se envasaron en crio viales de 2 mL pre enfriados a -20 °C.

Luego se agitaron en el vórtex por 15 segundos, rápidamente se sumergieron en Nitrógeno líquido por 15 segundos y después se pasaron al hielo seco para descongelar entre 30 a 60 segundos. Por último, se sonicaron durante 5 min en agua fría con hielo seco sumergido, todos los pasos anteriores se repitieron 4 veces; al final, se transvasaron las muestras a tubos cónicos de 1,5 mL y se centrifugaron las mismas a 20.000 x g x 15 min a -4°C. por último se llevaron los sobrenadantes a crio viales de 2 mL y se almacenaron a -80°C en ultracongelación hasta su preparación para ser evaluados por la técnica de UHPLC-MS-QTOF en modos de ionización positiva (+) en el laboratorio MetCore de la

universidad de los Andes en la ciudad de Bogotá D.C. las condiciones usadas en el Metcore para la obtención de la información se observan en la Figura S1.



1 - INFORMACIÓN DEL SERVICIO

Servicio Solicitado: Metabolómica no dirigida por LC-MS

Código del Servicio: 20M030

Código de la Cotización: NA

Número de muestras enviadas: 6

Número total de grupos: 2

Tipo de muestra: Extractos celulares

Códigos de los grupos de muestras:

G1: Sin lavar

G4: Lavado NaCl 0.9%

G2: Sin lavar

G5: Lavado NaCl 0.9%

G3: Sin lavar

G6: Lavado NaCl 0.9%

2- MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS

2.1. ANÁLISIS METABOLOMICA NO DIRIGIDA

2.1.1 Extracción de metabolitos para análisis por LC-MS

Las muestras fueron preparadas por el usuario. Los extractos entregados se centrifugaron a 16000 xg, 4°C, durante 10 minutos. Finalmente, se transfirió 100 µL a un vial de LC-MS para los análisis posteriores por cromatografía líquida de fase reversa acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (RP-LCMS-QTOF).

2.1.2 Análisis de las muestras por cromatografía líquida acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (RP-LC/MS-QTOF):

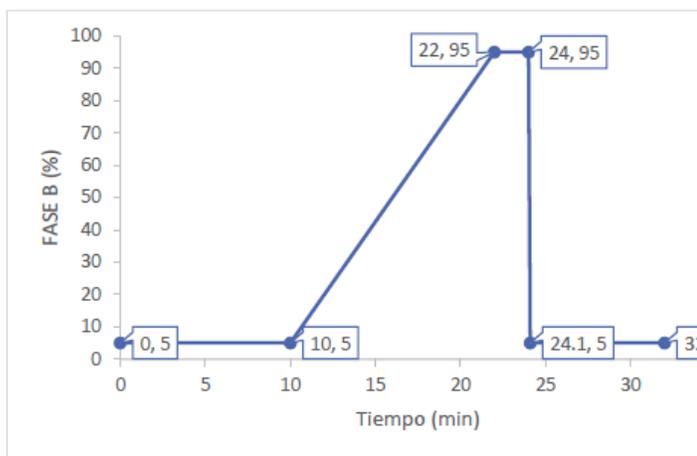
Las muestras se analizaron empleando un sistema de Cromatografía de Líquidos *Agilent Technologies* 1260 acoplado a un analizador de masas de cuadrupolo con tiempo de vuelo Q-TOF 6545 con ionización por electrospray. 2 µL de los extractos de metabolitos fueron inyectados en una columna C18 (InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (150 x 3.0 mm, 2.7 µm) a 40 ° C y una elución en gradiente compuesta de: 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en agua Milli-Q (Fase A) y 0.1 % (v/v) de ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B) con



un flujo constante de 0,3 mL/min. La detección por espectrometría de masas se realizó en modo ESI positivo en *full scan* de 70 a 1100 *m/z*. Durante todo el análisis, para la corrección de masas se emplearon dos masas de referencia: *m/z* 121.0509 (C₅H₄N₄) y *m/z* 922.0098 (C₁₈H₁₈O₆N₃P₃F₂₄). Más detalles de las condiciones del análisis se muestran en la Figura 1.

A. Gradiente de fases usado en el análisis de RP-LC/MS-QTOF(+)

| Tiempo (min) | Fase B (%) |
|--------------|------------|
| 0 | 5 |
| 10 | 5 |
| 22 | 95 |
| 24 | 95 |
| 24.1 | 5 |
| 32 | 5 |



B. Condiciones Espectrómetro de Masas

| Fuente – Dual AJS ESI | |
|------------------------|------|
| Vcap (V) | 3500 |
| Drying Gas (L/min) | 8 |
| Gas Temp (°C) | 325 |
| Nebulizer (psi) | 50 |
| Sheat Gas Temp (°C) | 350 |
| Sheat Gas Flow (L/min) | 11 |
| MS TOF | |
| Fragmentor (V) | 175 |
| Skimmer (V) | 65 |
| OCT RF Vpp (V) | 750 |

Figura 1. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida empleando RP-LC/MS-QTOF(+).

Figura S1. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida RP-LC/MS-QTOF (+), se describen además los grupos del ensayo piloto. (G1, G2 y G3) monocapas sin lavar y (G4, G5 y G6) monocapas lavadas con NaCl 2%.

Las señales obtenidas siguiendo la metodología de extracción de metabolitos piloto “sin lavar la monocapa” fueron adecuadas por lo cual se definió que las monocapas de los ensayos una vez fuera retirado el medio de cultivo no se lavarían con ninguna solución y se procedería los pasos siguientes de quenching y extracción de metabolitos mencionadas anteriormente.

Una vez conocidas las condiciones del lavado o no de la monocapa se realizó una segunda prueba piloto bajo las siguientes condiciones; células SW620 con DMSO 2% y células SW620 con DMSO 2% y la SCAF con código 13 (8B), dado que el DMSO fue utilizado como solvente para las SCAFs los resultados indican que las señales entre ambos grupos generaban diferencias significativas, ya que se encontró que para los análisis de PCA y OPLS-DA se verificaron distancias entre los grupos, además se obtuvieron VIP's con valores mayores a 1, indicando que hubo hallazgos diferenciales entre los grupos analizados, esto sugiere que el solvente utilizado no estaba generando ruido en el ensayo propuesto y que la diferencia estaba representada por la inducción de la SCAF 13.

Para este ensayo piloto se formaron 2 grupos cada uno con 6 réplicas

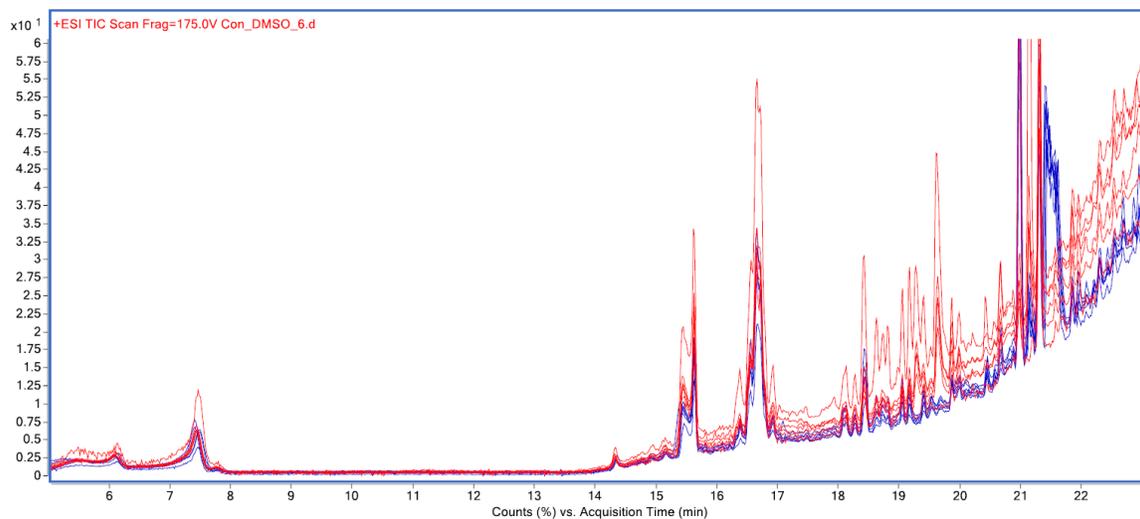
G1: células SW620 con el compuesto 13 ($C_{61}pCF_3$) denominado en este momento como 8B.

G2: células SW620 con dimetil sulfóxido (DMSO), ya que fue el vehículo donde se solubilizaron las SCAFs.

A las cuales después de seguir los pasos descritos anteriormente que pertenecen a A cada grupo se le realizó el tratamiento de detención del metabolismo (quenching) y extracción descrita anteriormente en este documento y una vez estuvieron en el laboratorio del MetCore se extrajeron 200 μ L y se llevaron a sequedad, luego se reconstituyeron en 200 μ L de MeOH y se inyectaron al cromatógrafo para los análisis en polaridad negativa 5 μ L y en positiva 10 μ L de cada una de las réplicas.

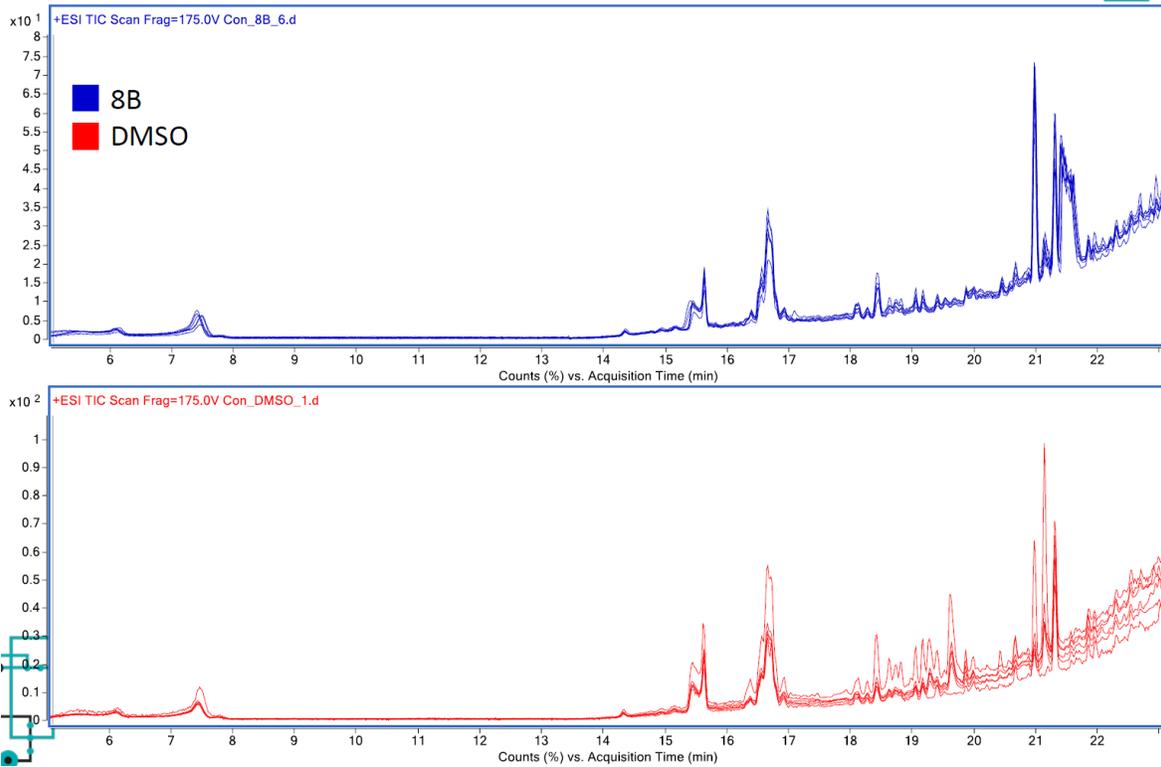
Perfiles cromatográficos, PCA, OPLS-DA y VIP's para la comparación entre grupos G1 – G2 polaridad positiva (+).

1. Polaridad positiva: Perfiles cromatograficos

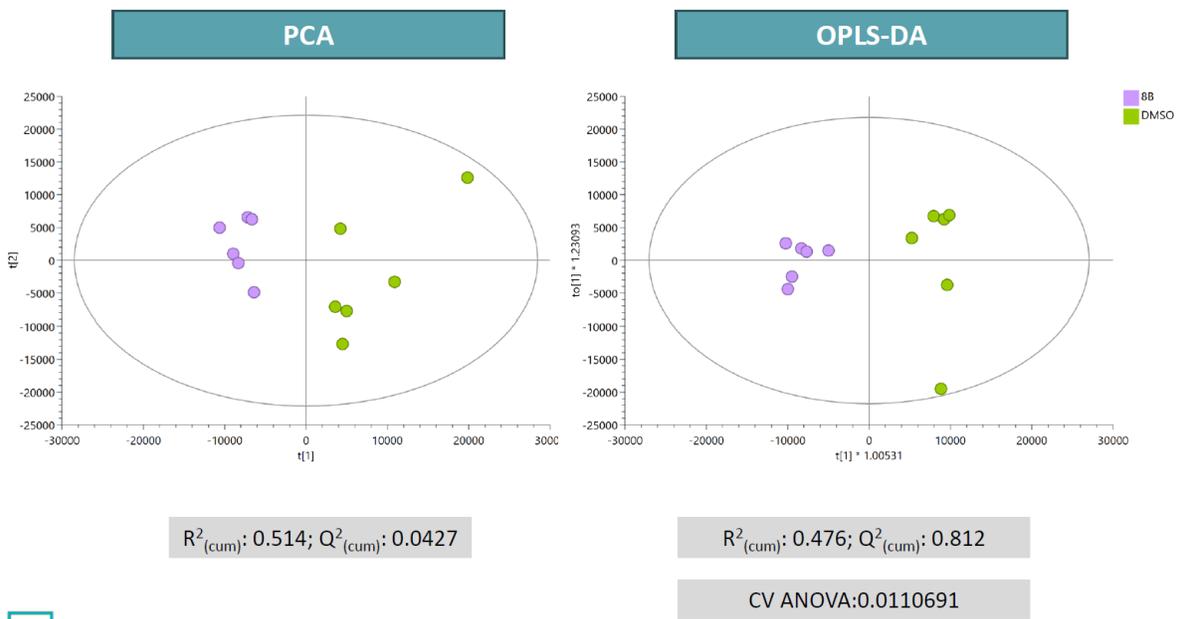


■ 8B
■ DMSO

1. Polaridad positiva: Perfiles cromatograficos



1. PCA y OPLS-DA: Polaridad positiva



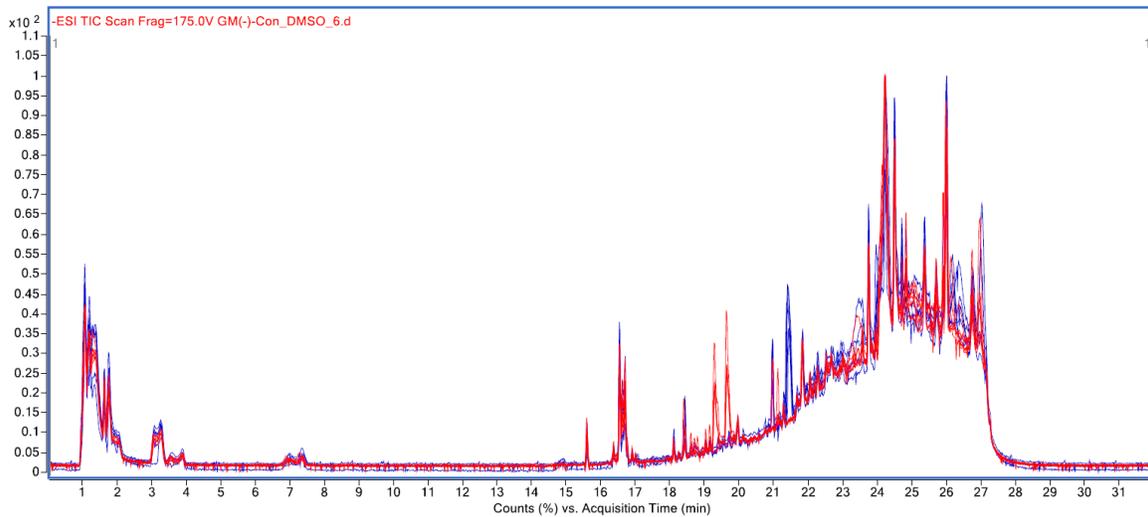
1. VIP: Polaridad positiva

| M+H | Mass | Feature | M3.VIP[1+1+0] | M3.VIP[1]cvSE * 2.44693 |
|----------|----------|--------------------|---------------|-------------------------|
| 120.0818 | 119.074 | 119.074@3.31_9 | 9.65732 | 12.3795 |
| 558.1014 | 557.0936 | 557.0936@21.43_10 | 8.85688 | 2.46504 |
| 376.2614 | 375.2536 | 375.2536@20.98_3 | 8.01258 | 2.79864 |
| 451.1694 | 450.1616 | 450.1616@20.12_4 | 6.43945 | 3.90734 |
| 387.1951 | 386.1873 | 386.1873@21.14_2 | 5.42388 | 6.46109 |
| 159.0423 | 158.0345 | 158.0345@21.43_33 | 5.01466 | 1.36161 |
| 416.1819 | 415.1741 | 415.1741@21.14_21 | 4.91948 | 1.7357 |
| 430.1983 | 429.1905 | 429.1905@21.28_26 | 4.68442 | 1.24614 |
| 402.1666 | 401.1588 | 401.1588@21_34 | 4.47901 | 1.38868 |
| 303.0613 | 302.0535 | 302.0535@21.43_46 | 4.31159 | 1.16634 |
| 335.1077 | 334.0999 | 334.0999@15.63_8 | 4.17657 | 7.32064 |
| 451.1664 | 450.1586 | 450.1586@19.39_17 | 4.10344 | 2.06993 |
| 335.1077 | 334.0999 | 334.0999@15.45_11 | 4.09143 | 5.68603 |
| 329.0771 | 328.0693 | 328.0693@21.44_48 | 4.08009 | 1.0854 |
| 475.3669 | 474.3591 | 474.3591@20.98_41 | 4.07863 | 1.39315 |
| 393.2883 | 392.2805 | 392.2805@20.98_43 | 3.77764 | 1.32822 |
| 556.0945 | 555.0867 | 555.0867@21.58_1 | 3.68664 | 2.30431 |
| 777.4205 | 776.4127 | 776.4127@21_80 | 3.26123 | 0.667002 |
| 508.1086 | 507.1008 | 507.1008@21.4_83 | 2.99387 | 0.822891 |
| 510.1068 | 509.099 | 509.099@21.4_84 | 2.96411 | 0.799849 |
| 572.0891 | 571.0813 | 571.0813@21.11_76 | 2.82007 | 0.976792 |
| 687.2172 | 686.2094 | 686.2094@18.64_149 | 2.68136 | 3.24853 |
| 628.1967 | 627.1889 | 627.1889@23.57_5 | 2.6556 | 6.66005 |
| 701.5625 | 700.5547 | 700.5547@23.78_188 | 2.62765 | 3.00494 |
| 572.0897 | 571.0819 | 571.0819@20.45_102 | 2.5481 | 0.826601 |
| 885.3715 | 884.3637 | 884.3637@23.89_60 | 2.46982 | 1.88259 |
| 735.3962 | 734.3884 | 734.3884@24.05_152 | 2.4639 | 2.20787 |
| 100.1325 | 99.1247 | 99.1247@23.7_306 | 2.46031 | 2.60602 |
| 392.2389 | 391.2311 | 391.2311@21.19_66 | 2.38833 | 1.11142 |
| 687.2171 | 686.2093 | 686.2093@19.06_413 | 2.32095 | 4.37923 |
| 296.26 | 295.2522 | 295.2522@22.87_207 | 2.31939 | 4.32063 |
| 768.5417 | 767.5339 | 767.5339@20.98_131 | 2.28763 | 0.861878 |
| 687.2171 | 686.2093 | 686.2093@18.64_379 | 2.27454 | 0.836231 |
| 703.5775 | 702.5697 | 702.5697@23.77_53 | 2.23115 | 1.70867 |
| 487.2333 | 486.2255 | 486.2255@24.31_467 | 2.19461 | 1.85175 |
| 309.1279 | 308.1201 | 308.1201@16.68_6 | 2.19252 | 1.6798 |
| 199.0736 | 198.0658 | 198.0658@21.43_198 | 2.16813 | 0.593266 |



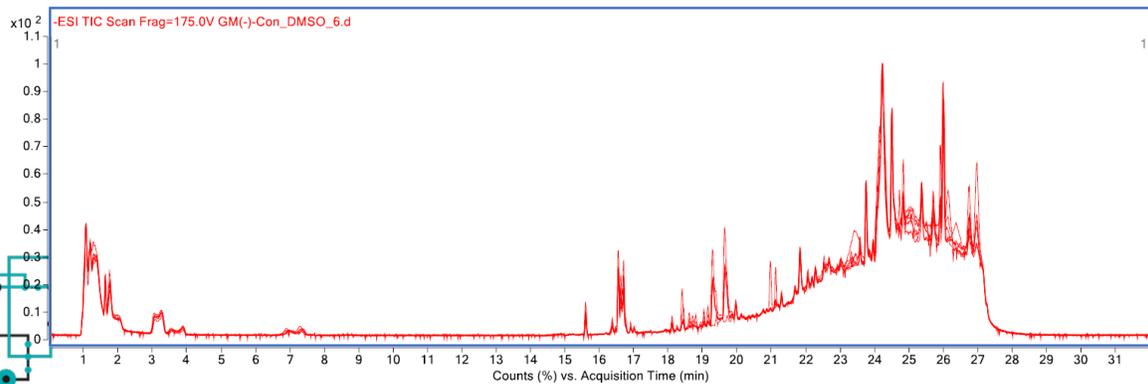
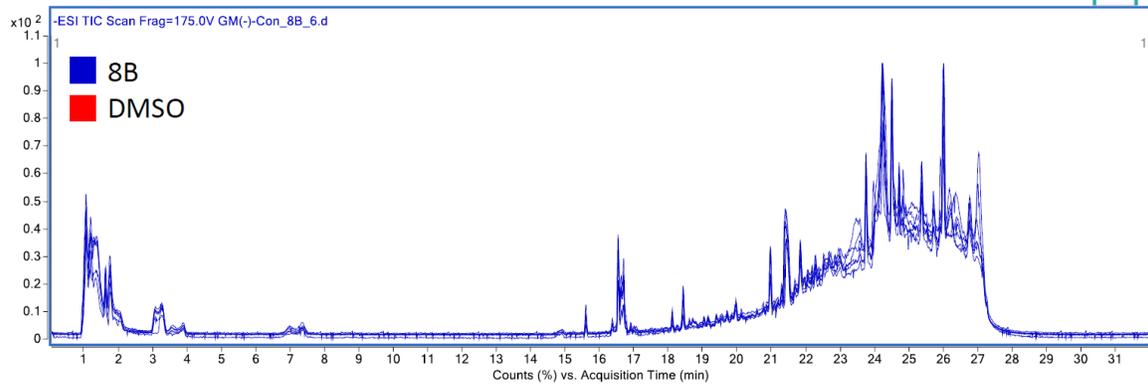
Perfiles cromatográficos, PCA, OPLS-DA y VIP's para la comparación entre grupos G1 – G2 polaridad negativa (-).

2. Polaridad negativa: Perfiles cromatograficos



■ 8B
■ DMSO

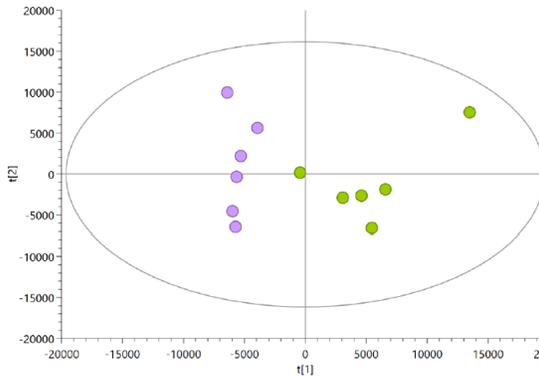
1. Polaridad negativa: Perfiles cromatograficos



1. Polaridad negativa

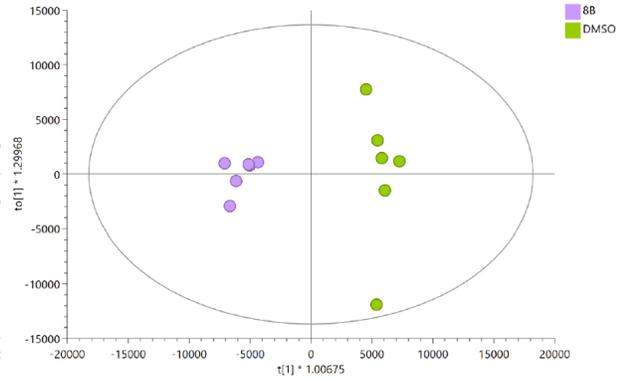


PCA



$R^2_{(cum)}: 0.5; Q^2_{(cum)}: 0.086$

OPLS-DA



$R^2_{(cum)}: 0.401; Q^2_{(cum)}: 0.784$

CV ANOVA:0.0175267



1. VIP: Polaridad negativa

| M-H | Mass | Primary ID | M3.VIP[1+1+0] | M3.VIP[1]cvSE * 2.44693 |
|----------|----------|--------------------|---------------|-------------------------|
| 646.0885 | 647.0963 | 647.0963@21.43_6 | 11.4928 | 4.13532 |
| 449.1499 | 450.1577 | 450.1577@19.65_1 | 11.3041 | 3.10969 |
| 449.1502 | 450.158 | 450.158@19.3_4 | 10.3941 | 2.83715 |
| 449.15 | 450.1578 | 450.1578@19.17_238 | 7.13917 | 9.37789 |
| 374.2447 | 375.2525 | 375.2525@20.97_12 | 7.12922 | 3.09517 |
| 96.9596 | 97.9674 | 97.9674@1.39_2 | 6.3227 | 5.72653 |
| 450.1535 | 451.1613 | 451.1613@19.65_494 | 6.14978 | 3.21324 |
| 96.9693 | 97.9771 | 97.9771@1.39_7 | 4.66115 | 4.89757 |
| 606.0735 | 607.0813 | 607.0813@1.4_5 | 3.74447 | 6.18144 |
| 385.1785 | 386.1863 | 386.1863@21.13_20 | 3.66571 | 4.78255 |
| 325.1842 | 326.192 | 326.192@23.85_8 | 3.46907 | 2.05408 |
| 331.1912 | 332.199 | 332.199@21.96_709 | 3.33175 | 1.91695 |
| 265.1479 | 266.1557 | 266.1557@21.84_13 | 3.13063 | 2.85988 |
| 473.2825 | 474.2903 | 474.2903@21.3_50 | 3.08579 | 3.51689 |
| 685.2001 | 686.2079 | 686.2079@18.62_292 | 2.77539 | 2.93745 |
| 149.0091 | 150.0169 | 150.0169@23.49_52 | 2.64143 | 2.31415 |
| 421.2264 | 422.2342 | 422.2342@23.76_3 | 2.50626 | 1.73561 |
| 333.207 | 334.2148 | 334.2148@21.74_425 | 2.45784 | 4.1836 |
| 685.2 | 686.2078 | 686.2078@19.16_152 | 2.34982 | 4.35859 |
| 685.0993 | 686.1071 | 686.1071@21.49_268 | 2.30537 | 0.678178 |
| 611.1441 | 612.1519 | 612.1519@1.64_43 | 2.29473 | 1.82338 |
| 333.2071 | 334.2149 | 334.2149@20.78_66 | 2.23848 | 2.43552 |
| 714.0757 | 715.0835 | 715.0835@21.44_237 | 2.23816 | 0.720876 |
| 776.5434 | 777.5512 | 777.5512@23.76_299 | 2.15125 | 2.97553 |
| 471.1316 | 472.1394 | 472.1394@19.65_130 | 2.15047 | 0.711948 |
| 403.1889 | 404.1967 | 404.1967@18.4_59 | 2.11346 | 2.57395 |
| 192.0486 | 193.0564 | 193.0564@18.44_79 | 2.0516 | 1.8484 |
| 388.1554 | 389.1632 | 389.1632@22.85_48 | 2.02485 | 2.48901 |
| 134.0608 | 135.0686 | 135.0686@1.77_14 | 2.01861 | 3.97229 |
| 297.1529 | 298.1607 | 298.1607@21.73_343 | 2.01698 | 2.6046 |
| 74.0066 | 75.0144 | 75.0144@18.44_110 | 1.99718 | 1.67379 |
| 471.1314 | 472.1392 | 472.1392@19.3_160 | 1.99311 | 0.664008 |
| 526.1651 | 527.1729 | 527.1729@18.12_53 | 1.9767 | 1.66244 |
| 685.1999 | 686.2077 | 686.2077@18.41_31 | 1.96418 | 2.62154 |
| 229.1342 | 230.142 | 230.142@16.63_73 | 1.91144 | 4.51889 |
| 311.1685 | 312.1763 | 312.1763@22.6_17 | 1.88944 | 2.55356 |
| 571.1651 | 572.1729 | 572.1729@21.16_205 | 1.84574 | 1.00849 |



Anexo 2. Condiciones del análisis RP-LC/MS-QTOF (+)

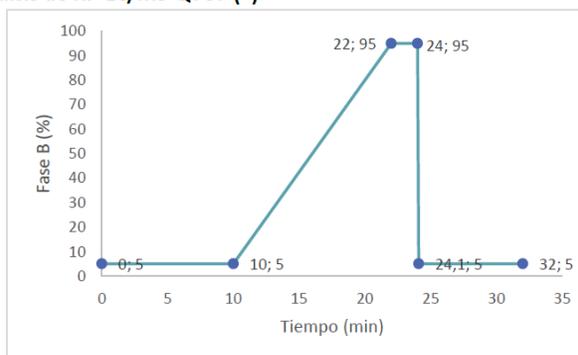


Core Facilities
Vicerrectoría de Investigación y Creación



A. Gradiente de fases usado en el análisis de RP-LC/MS-QTOF (+)

| Tiempo (min) | Fase B (%) |
|--------------|------------|
| 0 | 5 |
| 10 | 5 |
| 22 | 95 |
| 24 | 95 |
| 24.1 | 5 |
| 32 | 5 |



B. Condiciones Espectrómetro de Masas

Fuente – Dual AJS ESI

| | |
|------------------------|------|
| Vcap (V) | 3500 |
| Drying Gas (L/min) | 8 |
| Gas Temp (°C) | 325 |
| Nebulizer (psi) | 50 |
| Sheat Gas Temp (°C) | 350 |
| Sheat Gas Flow (L/min) | 11 |
| MS TOF | |
| Fragmentor (V) | 175 |
| Skimmer (V) | 65 |
| OCT RF Vpp (V) | 750 |

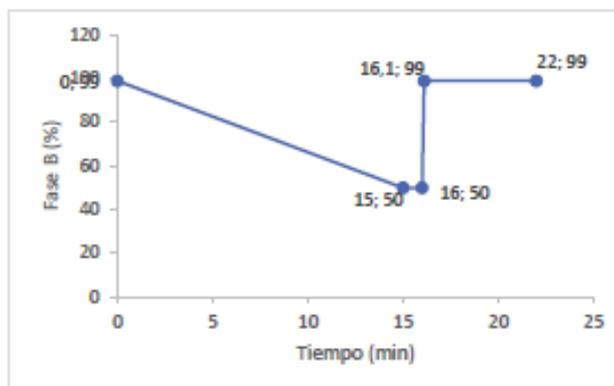
Figura 1. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida empleando LC/MS-QTOF.

Anexo 3. Condiciones del análisis HILIC-LC/MS-QTOF (-)



A. Gradiente de fases usado en el análisis de HILIC-LC/MS-QTOF (-)

| Tiempo (min) | Fase B (%) |
|--------------|------------|
| 0 | 99 |
| 15 | 50 |
| 16 | 50 |
| 16.1 | 99 |
| 22 | 99 |



B. Condiciones Espectrómetro de Masas

| Fuente – Dual AJS ESI | |
|------------------------|------|
| Vcap (V) | 3500 |
| Drying Gas (L/min) | 9 |
| Gas Temp (°C) | 325 |
| Nebulizer (psi) | 45 |
| Sheat Gas Temp (°C) | 375 |
| Sheat Gas Flow (L/min) | 11 |
| MS TOF | |
| Fragmentor (V) | 125 |
| Skimmer (V) | 47 |
| OCT RF Vpp (V) | 750 |

Figura 2. Condiciones del análisis de metabolómica no dirigida empleando HILIC-LC/MS-QTOF (-).

Yusof HM, Ab-Rahim S, Wan Ngah WZ, Nathan S, A Jamal AR, Mazlan M. Metabolomic characterization of colorectal cancer cell lines highlighting stage-specific alterations during cancer progression. *Bioimpacts*. 2021;11(2):147-156. doi: 10.34172/bi.2021.22. Epub 2020 Jun 10. PMID: 33842285; PMCID: PMC8022234.

Scoazec, M., Durand, S., Chery, A., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2014). Metabolomic Profiling of Cultured Cancer Cells. Cell-Wide Metabolic Alterations Associated with Malignancy, 165–178. doi:10.1016/b978-0-12-801329-8.00008-8.