



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

*FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y CENTRO DE QUÍMICA-
INSTITUTO DE CIENCIAS*

**IDENTIFICACIÓN DE INHIBIDORES DEL RECEPTOR RELACIONADO
A ESTRÓGENOS ALFA, EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS CONTRA
EL CÁNCER DE MAMA**

Tesis presentada para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias Químicas en el área de Bioquímica y Biología Molecular

LESLIE AZAREL CHALTEL LIMA

Presenta

D.C. PATRICIA AGUILAR ALONSO

Posgrado en Ciencias Químicas. BUAP

Directora

D.C. PAULINA CORTÉS HERNÁNDEZ

Centro de Investigación Biomédica de Oriente. IMSS

Directora

Febrero 2020

Reconocimientos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Paulina Cortés Hernández y la Dra. Patricia Aguilar Alonso en el laboratorio de Biología Celular y Biología de la Reproducción del Centro de Investigación Biomédica de Oriente, IMSS.

A la Universidad de las Américas Puebla (UDLAP) por el uso de las instalaciones del laboratorio de cómputo, así como al Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez por el asesoramiento metodológico del análisis *in silico* del proyecto.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por el Fondo de Investigación en Salud (FIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), con número de registro FIS/IMSS/PROT/G16/159.

Al Dr. Juan Carlos Flores Alonso por proporcionar las instalaciones para desarrollar el proyecto, así como el asesoramiento metodológico para realizar los ensayos de inmunofluorescencia.

A Nohemí Cuautle Martínez por su ayuda en los ensayos de luciferasa y cultivo celular.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la coordinación de investigación en salud, IMSS por las becas proporcionadas para la realización de los estudios de maestría con número de registro 862456 y R-2016-2106-3 respectivamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP) y por la beca proporcionada para finalizar los estudios de maestría con número de expediente 32M.

A la coordinación de investigación en salud, IMSS, por el apoyo proporcionado para presentar los resultados de este proyecto en XXVIII Foro Nacional de Investigación en Salud 2019, XXVII Foro Nacional de Investigación en Salud 2018 y XXV Foro Norte de Investigación en Salud.

Al comité revisor por los comentarios para la mejoría de esta tesis de Maestría, conformado por Dra. Lourdes Millán Pérez-Peña, Dra. Mary Cruz Anaya Ruiz, Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez y Dr. Alfonso Díaz Fonseca.



Secretaría
de Educación
Gobierno de Puebla

CONCYTEP
Consejo de Ciencia
y Tecnología del Estado
de Puebla

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

H. Puebla de Z., a 13 de febrero de 2020
Asunto: Agradecimiento por el apoyo recibido de
Becas -Tesis Concytep 2019.

Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla

PRESENTE

Sirva este medio para avalar que el suscrito **Leslie Azarel Chaltel Lima** fungió como beneficiario/a del Programa Becas – Tesis Concytep 2019, el cual tiene el objetivo de brindar estímulos económicos a estudiantes de educación superior en instituciones del Estado de Puebla que busquen obtener su título profesional vía defensa de tesis dentro del periodo 01 de julio de 2019 al 31 de marzo de 2020.

En mi carácter de beneficiaria del programa antes citado, extendo un cordial agradecimiento al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (Concytep) por el incentivo económico otorgado, mismo que permitió satisfactoriamente la elaboración y conclusión de la tesis titulada **"Identificación de inhibidores del receptor relacionado a estrógenos alfa, en busca de nuevos fármacos contra el cáncer de mama"**, mediante la cual se obtuvo el grado de **Maestra en Ciencias Químicas** por la Facultad de Ciencias Químicas y el Centro de Química – Instituto de Ciencias de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**.

Aprovecho la ocasión para certificar que el monto total recibido concerniente al apoyo otorgado por el Concytep consistió en **\$18,000.00 (dieciocho mil pesos 00/100 M.N.)**.

No omito comentar que la existencia de Programas y actividades encaminadas al desarrollo profesional de los estudiantes de Instituciones de Educación Superior en el Estado de Puebla, como el programa del cual fui beneficiaria, desencadenan buenas prácticas para elevar el nivel de competitividad y productividad en nuestro Estado, y por esto no dudo en reiterar mi más sincero agradecimiento.

Atentamente

Leslie Azarel Chaltel Lima

Beneficiario/a del Programa de Becas -Tesis Concytep 2019.

No. Exp.32M



Abreviaturas

AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ATCC	American Type Culture Collection
AUC ₀₋₂₄	Área bajo la curva durante 24 horas
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
JAK	Cinasas Janus
Rb	Proteína del retinoblastoma
RMN	Resonancia magnética nuclear
STAT	Transductor de señal y activador de proteínas de transcripción

Tabla de contenido

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
REPOSICIONAMIENTO DE FÁRMACOS.....	4
EJEMPLOS REPRESENTATIVOS DE RF.....	6
<i>Sildenafil</i>	6
<i>Cloroquina</i>	7
<i>Metformina</i>	8
ESTRATEGIAS PARA EL RF	8
<i>Busqueda por similitud</i>	9
<i>Acoplamiento molecular</i>	10
CÁNCER	12
<i>Cáncer de mama</i>	12
Subtipos de cáncer de mama.....	12
<i>Características de las células tumorales</i>	14
Desregulación energética celular	15
Inducción a la angiogénesis	15
RECEPTOR RELACIONADO A ESTRÓGENOS ALFA.....	16
<i>Receptor relacionado a estrógenos alfa en cáncer</i>	17
<i>Regulación de la actividad de ERRα</i>	18
JUSTIFICACIÓN	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
HIPOTESIS	21
OBJETIVOS GENERALES	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
METODOLOGÍA	23
ANÁLISIS IN SILICO.....	23
OBTENCIÓN DE BACTERIAS QUIMIOCOMPETENTES	23
SISTEMA DE REPORTERO TRANSCRIPCIONAL DE LUCIFERASA	24
OBTENCIÓN DE PLÁSMIDO CONTROL: ERR α (-)	24
PCR	26
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5 ALFA QUIMIOCOMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO.....	26
PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	27
CULTIVO CELULAR	29
ENSAYO DE LUCIFERASA	30
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	31
ENSAYO DE CLONOGENICIDAD	31
ENSAYO DE INMUNOFUORESCENCIA.....	32
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
ESQUEMA DE TRABAJO GENERAL	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
ANÁLISIS IN SILICO.....	34
ANÁLISIS IN VITRO	43
<i>Estándarización del ensayo de luciferasa</i>	43

<i>Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz in silico sobre la actividad transcripcional de ERRα mediante el ensayo de luciferasa.</i>	<i>49</i>
<i>Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz in silico, sobre ensayos de clonogenicidad y de proliferación celular.</i>	<i>52</i>
<i>Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz in silico, sobre la localización celular de ERRα.</i>	<i>53</i>
CONCLUSIONES.	63
PERSPECTIVAS	63
ANEXO 1	65
REFERENCIAS.	71

Resumen

El receptor relacionado a estrógenos α (ERR α), un receptor nuclear huérfano, se ha relacionado con varios mecanismos que contribuyen a un mal pronóstico en el cáncer de mama, como la desregulación energética celular y angiogénesis. La inhibición de ERR α con XCT790, impide la adaptación metabólica, disminuye el tamaño del tumor y la angiogénesis en modelos murinos. Por lo tanto, ERR α es un atractivo blanco molecular para complementar el tratamiento de cáncer de mama.

En el presente trabajo se identificaron mediante docking diez compuestos sugerentes de inhibir a ERR α . Estos compuestos tienen usos clínicos diferentes al cáncer de mama y son fármacos aprobados por la FDA, por lo que su seguridad y farmacocinética ya ha sido caracterizada. En el proyecto se evaluó el efecto de cinco compuestos de la predicción *in silico* sobre la actividad transcripcional y localización celular de ERR α , así como la proliferación celular de las líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-231 mostrando que gliburida y gliquidona disminuyen la actividad transcripcional de ERR α y su localización nuclear, al igual que la proliferación celular. Con lo anteriormente mencionado, sugerimos a gliburida y gliquidona como agonistas inversos de ERR α , por lo que una mayor caracterización de los efectos de estos compuestos en el cáncer de mama permitiría el reposicionamiento de estos fármacos generando una terapia neoadyuvante para este padecimiento en menor tiempo y costo.

Introducción

Reposicionamiento de fármacos

El camino que un medicamento recorre desde el laboratorio que lo investiga hasta un anaquel de medicamentos suele ser largo y costoso, ya que el desarrollo de novo de un fármaco generalmente abarca entre 12 y 15 años [1,2]. Este proceso se divide en 2 secciones: preclínica y clínica, excluyendo la vigilancia posterior a la comercialización durante toda la vida útil del fármaco. Las pruebas de laboratorio preclínicas evalúan la actividad biológica y seguridad del nuevo compuesto y en promedio tarda 5.5 años en completarse [3]. Sobre la base de la seguridad mostrada en ensayos con animales y estudios de laboratorio, los candidatos a fármacos proceden a los ensayos clínicos en los cuales se prueba la seguridad y la eficacia de los medicamentos en participantes humanos voluntarios y se investiga cualquier reacción adversa no documentada con anterioridad (Figura 1).

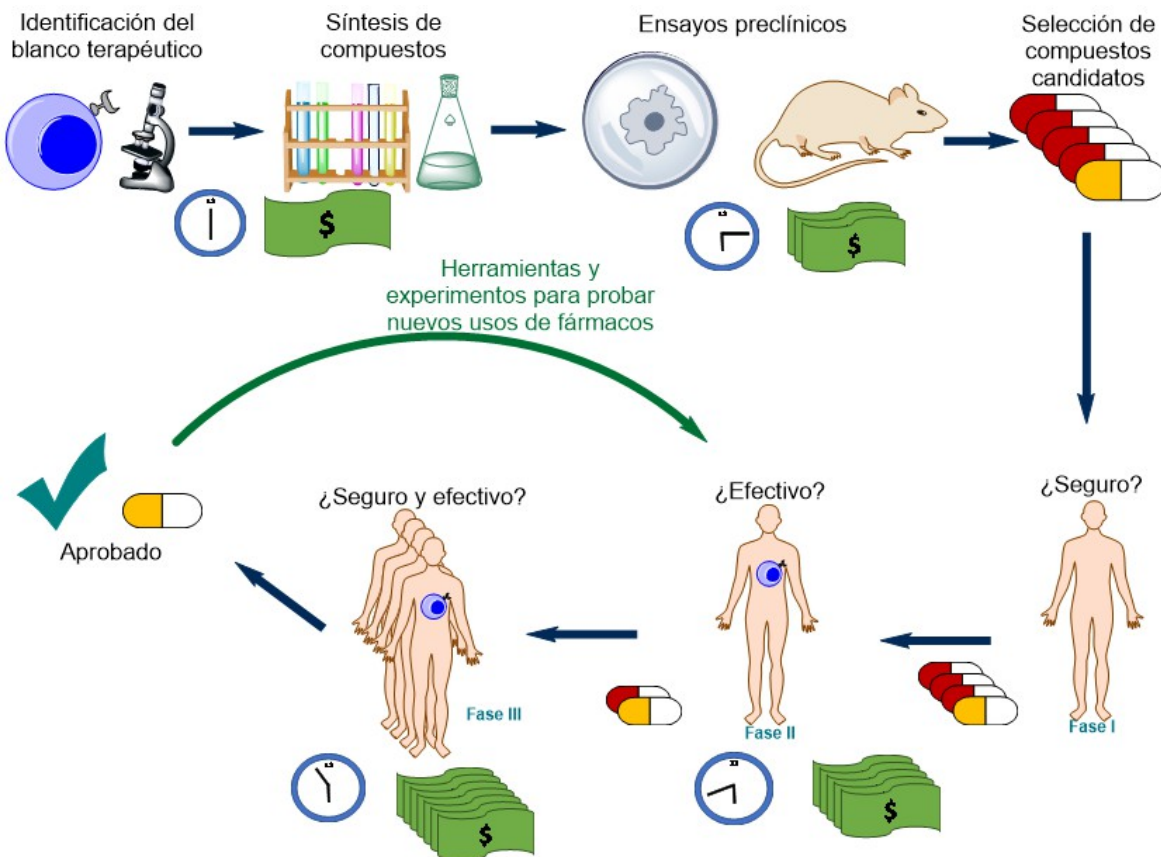


Figura 1. Proceso de desarrollo de novo y reposicionamiento de fármacos. En flechas azules se representa el proceso de desarrollo de novo, señalando algunos parámetros como tiempo, costo y tasa de éxito. En flechas y letras verdes se representa el “atajo” que consiste en el reposicionamiento de fármacos.

Aproximadamente 5 de 5000 nuevos medicamentos completan la fase preclínica y avanzan a los ensayos clínicos en humanos [3]. De esos 5 candidatos, sólo 1 medicamento suele ser aprobado por la FDA y llega al mercado [1,3]. Por lo tanto, la industria farmacéutica se enfrenta a grandes obstáculos en el desarrollo de *novo* de medicamentos [3] sin mencionar los obstáculos regulatorios cada vez mayores. En consecuencia, otros enfoques para la generación de nuevas terapias han sido propuestas, por ejemplo el reposicionamiento de fármacos (RF) que implica identificar nuevos usos clínicos para un medicamento ya existente y aprobado [1], y se basa en dos principios: 1) un fármaco no es afín exclusivamente a un blanco terapéutico, y 2) un blanco puede estar asociado con múltiples enfermedades (redundancia molecular de blancos biológicos) [4]. El RF es una estrategia prometedora en la industria farmacéutica, ya que los candidatos a reposicionamiento a menudo han pasado por varias etapas de desarrollo clínico por lo que tienen perfiles de seguridad y farmacocinéticos bien conocidos. Así, esta estrategia reduce considerablemente los recursos necesarios para desarrollar cualquier terapia y aumenta la probabilidad de que el medicamento ingrese desde la Fase I al mercado para la nueva indicación terapéutica (Figura 1). Por consiguiente, el interés por la investigación en el RF ha ido en aumento en la última década, reflejándose en el número de publicaciones científicas (Figura 2), siendo los países mayormente reconocidos por ser desarrolladores de fármacos los que cuentan con mayor número de investigaciones en el campo del RF (Figura 3).

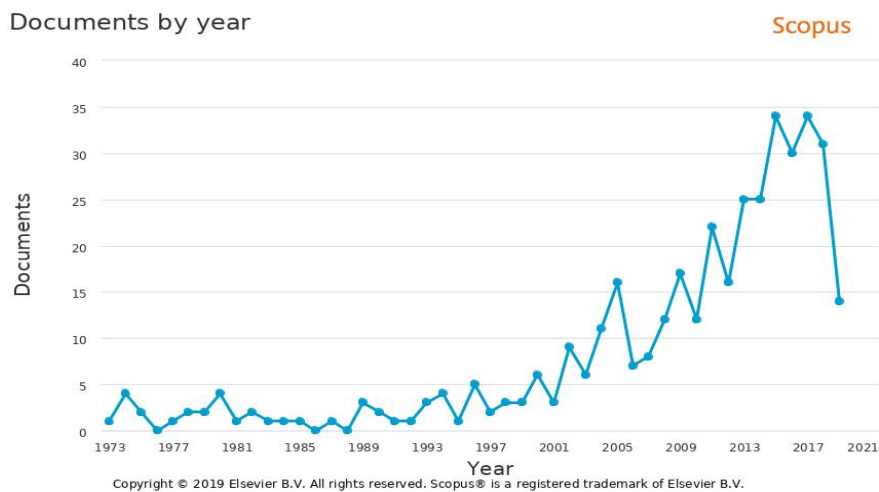


Figura 2. La investigación en el reposicionamiento de fármacos ha ido en aumento en la última década. Número de publicaciones por año reportadas por Scopus utilizando "Drug repositioning" OR "Drug repurposing" como frases de búsqueda. Gráfica generada en junio 2019 usando el sitio <https://www.elsevier.com/es-mx/solutions/scopus>

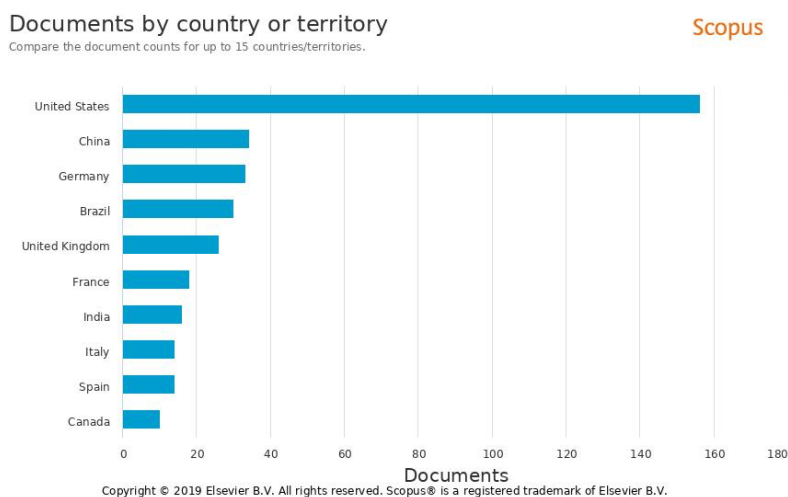


Figura 3. Los principales países desarrolladores de fármacos son los países que cuentan con mayor número de publicaciones en el reposicionamiento de fármacos. Número de publicaciones por país en los últimos cinco años. Datos reportados por Scopus utilizando "Drug repositioning" OR "Drug repurposing" como frases de búsqueda. Gráfica generada en junio 2019 usando el sitio <https://www.elsevier.com/es-mx/solutions/scopus>

Ejemplos representativos de RF

Sildenafil

En 1980 Pfizer buscaba fármacos para el tratamiento de angina de pecho, desarrollando así sildenafil (Viagra). Este fármaco inhibe la fosfodiésterasa 5 (PDE5) y así buscaba disminuir la resistencia vascular y la agregación plaquetaria en las arterias coronarias, permitiendo un mayor flujo sanguíneo coronario. Sin embargo, los efectos cardiovasculares deseados no se observaron en los voluntarios sanos evaluados en Inglaterra, en 1991–1992 [1]. A pesar de que las pruebas preclínicas mostraron que sildenafil producía dilatación de la arteria coronaria en perros, conejos y ratas, además de inhibir la formación de trombos en conejos [5], los ensayos de fase clínica, con dosis de 20 a 200 mg mostraron efectos cardiovasculares mínimos y transitorios en humanos [5]. Sin embargo, se observaron erecciones del pene como efecto secundario, ya que 5 de 8 hombres que tomaron 75 mg y 3 de 9 hombres que tomaron 50 mg de sildenafil informaron una mayor tendencia a experimentar erecciones [5]. A partir de este hallazgo se desarrollaron experimentos de ciencia básica para evaluar la distribución tisular de fosfodiesterasas, en los que se demostró que la principal actividad de la PDE en el ventrículo cardíaco humano es la PDE1 dependiente de calcio / calmodulina, mientras PDE5 es mayormente expresada en el tejido eréctil [6,7]. Esta enzima es responsable de la hidrólisis de GMPc en el músculo liso trabecular, proveniente de la activación de la enzima guanilato ciclasa por la liberación de óxido nítrico (NO), originado a partir de la óxido nítrico sintasa de nervios parasimpáticos en el endotelio del pene por estimulación

sexual [8]. La actividad de PDE5 genera la relajación de la musculatura lisa mediada por la degradación de GMPc inducida por NO, lo que finalmente resulta en la restauración de la flacidez del pene; por lo que la inhibición por sildenafil de la PDE5 reduciría las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, inhibiendo la contractilidad del músculo liso y, así permitiendo la respuesta eréctil [8,9]. Con estos hallazgos en 1996 el Centro de Investigación de Pfizer reportó a sildenafil, como una novedosa terapia oral efectiva para hombres con disfunción eréctil [9] y en 1998 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de este padecimiento, y en tan sólo 5 años de su aprobación, sildenafil generó ganancias de 1.8 billones de dólares [1].

Cloroquina

El primer agente antimalárico natural, la quinina, se atribuye a los descendientes incas en Perú, quienes curaron a la condesa de Chinchón de una enfermedad febril con un misterioso polvo de corteza del árbol de la chinchona en 1630. A partir de este hallazgo, se realizó la síntesis de derivados de la quinina, obteniendo aminoquinolinas que se investigaron a partir de 1943, como parte del extenso programa cooperativo de investigación antimalárica en los Estados Unidos [10,11]. Se ha demostrado que la cloroquina inhibe la enzima parasitaria hemo polimerasa (enzima parasitaria que polimeriza la ferriprotoporfirina para formar hemazoina) de *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*, y *P. falciparum*, que convierte el hemo tóxico en hemazoina no tóxica, lo que resulta en la acumulación de hemo tóxico dentro del parásito. Este agente también puede interferir con la biosíntesis de los ácidos nucleicos del parásito. Durante la segunda guerra mundial, millones de soldados fueron administrados con estos compuestos como profilaxis antimalárica, y las observaciones indicaron que este tratamiento mejoró las erupciones y la artritis inflamatoria de los soldados [11]. Desde entonces, se estableció el papel de los antimaláricos en las enfermedades reumáticas y hoy en día su uso está muy extendido en el Lupus eritematoso sistémico (LES) y en la artritis reumatoide (AR). La forma sintética de hidroxiclороquina se introdujo en 1955 y se diferencia de la cloroquina solo por un grupo hidroxilo, disminuyendo su toxicidad mientras conserva su eficacia [12].

Además de tener efectos para el tratamiento de malaria, LES y AR, otros efectos han sido atribuidos a la cloroquina y sus derivados. El efecto antineoplásico de los antimaláricos se observó por primera vez cuando un programa de profilaxis con cloroquina contra la malaria en Tanzania se asoció con una reducción en la incidencia del linfoma de Burkitt [12,13]. Más tarde, se demostró

que la cloroquina previene el desarrollo espontáneo de linfoma en modelos murinos de linfoma de Burkitt humano y ataxia telangectasia, mediante la supresión de la autofagia y la inducción de la vía de muerte celular dependiente de p53 [12].

Metformina

Enfermedades como obesidad y diabetes incrementan el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer [14], como cáncer cervicouterino [15], cáncer de mama [16] y cáncer pancreático [17]. Se ha propuesto que, en los pacientes con resistencia a la insulina con hiperinsulinemia secundaria, la insulina puede tener un posible efecto mitogénico a través de su unión al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina. Además, la hiperglucemia por sí misma puede promover la carcinogénesis directamente o indirectamente al aumentar el estrés oxidativo [18]

Sin embargo, el tratamiento de estos padecimientos con metformina se asocia con un riesgo sustancialmente menor de mortalidad e incidencia del cáncer de mama, en comparación con otros tratamientos [18].

La metformina es una biguanida oral, indicada como un complemento de la dieta y el ejercicio para aumentar el control glucémico en pacientes diagnosticados con diabetes tipo 2. La metformina reduce la producción hepática de glucosa, disminuye la absorción intestinal de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina al aumentar la captación y la utilización de la glucosa periférica. Sin embargo, existe evidencia epidemiológica que relaciona el uso de metformina con una disminución en la incidencia global de cáncer de aproximadamente 10 a 40 %, junto con una disminución en la mortalidad en un rango similar [19–22]. Los estudios preclínicos han sugerido un efecto antitumoral de la metformina, mediado por la inhibición de la vía de la rapamicina en los mamíferos (mTOR), que se sabe que es un efector de la señalización del factor de crecimiento activado en células malignas, así como la activación de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) [21]. Además, puede inhibir la expresión de ciclina D1 y la fosforilación de Rb, que inhiben aún más el crecimiento celular y promueven la senescencia [21].

Estrategias para el RF

Aunque algunos casos de reposicionamiento de fármacos han surgido de serendipia mediante el descubrimiento de efectos benéficos en pacientes con cierto tratamiento, se han realizado numerosos esfuerzos para realizar el reposicionamiento de fármacos deliberadamente con enfoques más sistemáticos, o bien para identificar el blanco molecular por el cual estos

fármacos ejercen su efecto. Uno de los enfoques más importantes en el RF es el análisis *in silico*, ya que muestra grandes ventajas, por ejemplo, no es necesario la síntesis química de los compuestos ni la purificación del blanco molecular, además estas herramientas nos permiten identificar el modo de interacción ligando-receptor [23,24]. Las técnicas *in silico*, también llamadas de escaneo virtual (VS) generalmente se clasifican en dos categorías principales: basadas en estructura, la cual es más adecuada para encontrar ligandos estructuralmente nuevos y es el método más usado cuando la estructura 3D de la proteína blanco ha sido caracterizada experimentalmente (por ejemplo cristalografía de rayos X, RMN o modelado por homología), y basadas en ligando, mayormente usada cuando la estructura 3D de la proteína blanco es desconocida. El siguiente apartado, tiene como objetivo revisar algunas de las herramientas *in silico* para el RF.

Busqueda por similitud

La búsqueda por similitud es un concepto clave en el descubrimiento de fármacos y en el RF se ha utilizado de forma rutinaria en el descubrimiento y diseño de nuevas moléculas. Se basa en la noción de que si dos moléculas comparten propiedades estructurales y fisicoquímicas, también pueden compartir funciones biológicas (Figura 4) [25]. Se han sugerido diversos tipos de representaciones estructurales para medir la similitud entre dos moléculas. Estos incluyen propiedades fisicoquímicas, índices topológicos, gráficos moleculares, características de farmacóforos, formas moleculares, campos moleculares, etc. Además, hay varios métodos para cuantificar la similitud entre dos representaciones estructurales, por ejemplo, coeficiente de Tanimoto, índice de datos, coeficiente de coseno, distancia euclidiana, índice de Tversky, etc. [26]. Dichas representaciones por similitud, pueden estar dadas en 1D, 2D o 3D, en donde la representación por similitud en 3D, como en las herramientas ROCS [27,28], MedSuMoLig [29], shaEP [30] o Superimposé [31], busca explícitamente formas comunes en las conformaciones del compuesto y en algunos casos considera la composición química. Estas herramientas proporcionan mayor información, debido a que las moléculas con forma 3D similar y con propiedades químicas similares pueden compartir actividades biológicas, incluso si sus representaciones 1D y 2D no son similares, porque la afinidad de unión entre las moléculas y las proteínas blanco depende de las interacciones atómicas en disposición espacial. Sin embargo, una sola molécula generalmente tiene muchas representaciones en 3D, lo que hace que los modelos en 3D sean más exigentes en

términos de espacio de almacenamiento y tiempo de cálculo. Por el contrario, aunque los descriptores 2D como LigandInfo [32] o ChemMine [33], generan información útil omiten las características relacionadas con la disposición espacial de la molécula (por ejemplo, forma o distribución atómica), mientras que los descriptores 3D explican correctamente estas propiedades al evaluar la similitud [34].

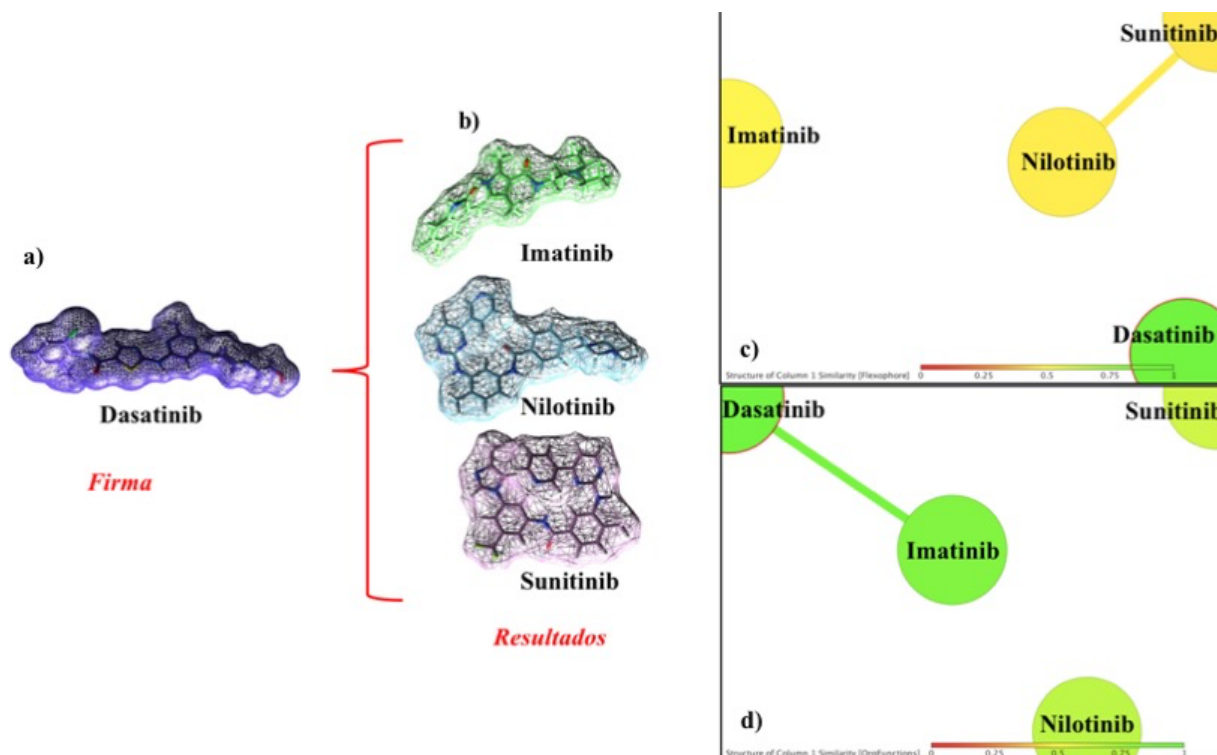


Figura 4. El análisis por similitud identifica compuestos similares a partir de un compuesto firma. La imagen representa la selección del a) compuesto firma dasatinib y b) la identificación por análisis de similitud de un grupo de compuestos inhibidores de receptores tirosina cinasa. Las imágenes c) y d) muestran los resultados de un análisis utilizando representaciones de similitud en c) flexibilidad y d) química usando como firma a dasatinib. La similitud se representa en una escala de color en la que los puntos verdes y amarillos muestran similitud de alta a intermedia, mientras que los de color naranja a rojo representan poca similitud al compuesto firma. Debido a que este grupo de fármacos pertenecen a la familia de inhibidores SRC/ABL tirosina cinasa, su composición química y su flexibilidad es muy similar, observándose en la representación c) y d) los círculos mayormente en verde. Análisis y gráficas generadas a partir del programa Chimera y DataWarrior (Open molecules).

Acoplamiento molecular

El método de acoplamiento molecular, también conocido como docking, es una de las técnicas de mayor uso en el diseño de fármacos. Esta técnica implica la predicción de la conformación y orientación del ligando (pose) dentro del sitio de unión de una proteína blanco (Figura 5). El proceso comienza con la aplicación de algoritmos de acoplamiento que posicionan a moléculas pequeñas en un sitio de la proteína en el cual se pueda albergar un ligando [23]. Los algoritmos de muestreo de ligando son de tres tipos: coincidencia de forma, búsqueda sistemática

y algoritmos estocásticos [24]. Los algoritmos de acoplamiento pueden considerar la proteína como un cuerpo rígido, o como un cuerpo blando con cadenas laterales flexibles, o bien sólo ciertos dominios flexibles [24].

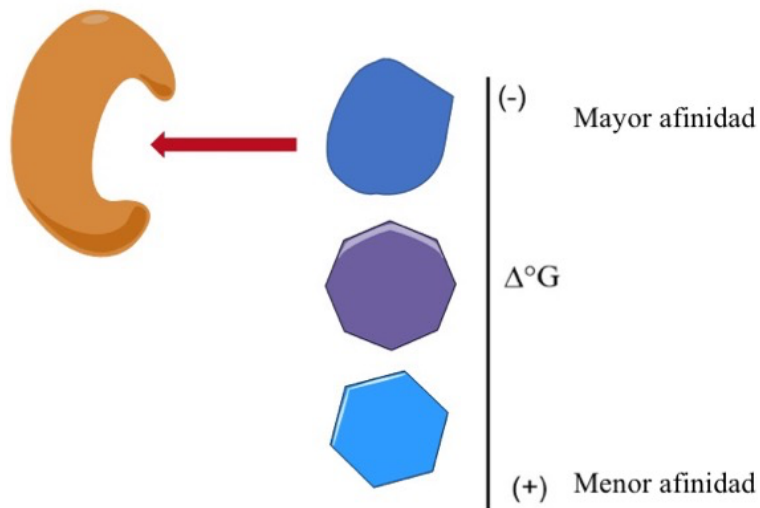


Figura 5. La probabilidad de un compuesto de "acoplarse" al sitio de unión de una proteína blanco está dada por la energía libre de Gibbs, la cual es de utilidad para las puntuaciones implementadas en los softwares de docking.

El diseño de funciones y esquemas confiables de puntuación es de fundamental importancia durante el uso de docking. Las funciones de puntuación implementadas en los programas de acoplamiento hacen varias suposiciones y simplificaciones en la evaluación de complejos modelados. Actualmente se aplican tres tipos o clases de funciones de puntuación: funciones de puntuación basadas en campo de fuerza, empíricas y basadas en el conocimiento. Los campos de fuerza de la mecánica molecular generalmente cuantifican la suma de dos energías, la energía de interacción receptor-ligando y la energía interna del ligando (como la tensión estérica inducida por la unión) [23]. Varias funciones de puntuación de campo de fuerza se basan en diferentes conjuntos de parámetros de campo de fuerza. Por ejemplo, G-Score se basa en el campo de fuerza Tripos y AutoDock en el campo de fuerza AMBER. Las interacciones entre ligando y receptor se describen con mayor frecuencia mediante el uso de fuerzas de Van der Waals y términos de energía electrostática. El término energético de van der Waals está dado por una función potencial de Lennard-Jones, mientras que los términos electrostáticos se explican por una formulación de Coulombic con una función dieléctrica dependiente de la distancia que disminuye la contribución de las interacciones carga-carga [23].

Cáncer

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación y diseminación celular descontrolada. Si bien una célula normal presenta diferentes formas de regulación de la división celular, una célula cancerosa mantiene la señalización proliferativa mediante la producción de factores de crecimiento, a los que la célula puede responder mediante la expresión de receptores afines. Además, esta activación en la señalización proliferativa puede estar dada por la activación constitutiva de los componentes de vías de señalización que funcionan río abajo de estos receptores, lo que evita la necesidad de estimular estas vías mediante la activación de receptores mediada por ligando.

Cáncer de mama

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente entre las mujeres, afecta a 2.1 millones de mujeres cada año, y también causa la mayor cantidad de muertes relacionadas con el cáncer entre las mujeres en el mundo. En 2018, se estima que 627000 mujeres murieron de cáncer de mama, es decir, aproximadamente el 15 % de todas las muertes por cáncer entre mujeres [35].

En México las tasas de mortalidad observadas por tumor maligno de mama han tenido una tendencia al alza en el periodo de 2011 a 2016, siendo 2016 el año donde se ubica la tasa con mayor mortalidad, registrándose 16 defunciones por cada 100 000 mujeres de 20 años y más [36].

Subtipos de cáncer de mama

Debido a la heterogeneidad del cáncer de mama, diferentes formas de clasificación han sido propuestas. Para esta finalidad, se han utilizado técnicas como perfiles de expresión génica e inmunohistoquímica (IHC), siendo esta última la más utilizada.

Una clasificación IHC jerárquica de los tumores de cáncer de mama es luminal o no luminal, refiriéndose como luminales a aquellos tumores que sobreexpresan receptores hormonales (receptor de estrógenos y receptor de progesterona), mientras que no luminales a aquellos con baja expresión de estos receptores hormonales (RH). A su vez, estos tipos pueden subclasificarse en función a la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), y además pueden subclasificarse en función al estatus de expresión de marcadores basales generando así 8 subtipos mediante la clasificación IHC [37] (Figura 6).

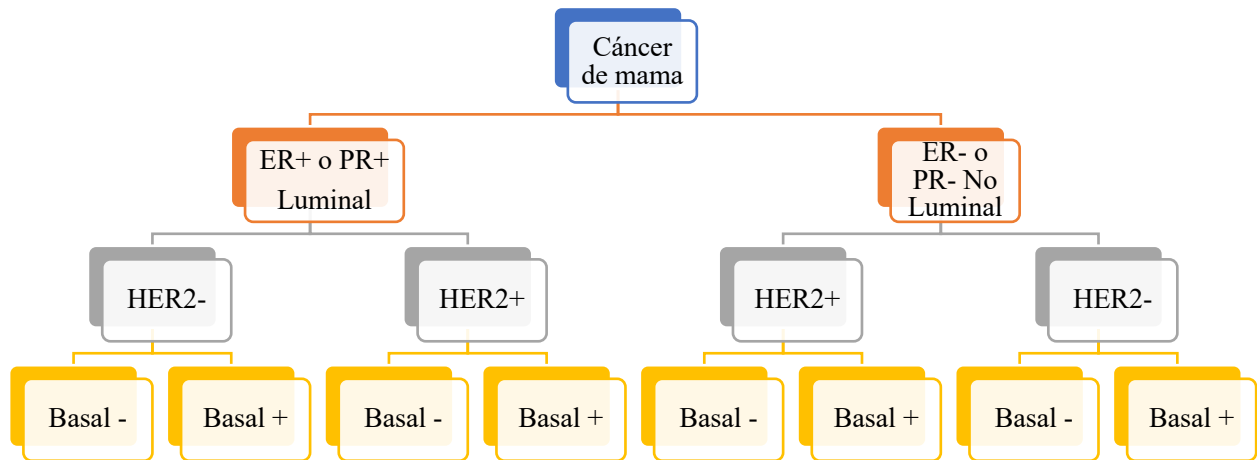


Figura 6. Clasificación de los subtipos de cáncer de mama según el perfil inmunohistoquímico.

Por otro lado, la clasificación basada en perfiles de expresión génica proporciona los siguientes subtipos: el Luminal A es aquel en el que se sobreexpresa RH, mientras que los tumores clasificados como Luminal B son aquellos con sobreexpresión de RH y HER2 o Ki67. Los tumores no luminales, como en la clasificación IHC, son aquellos que no sobreexpresan RH, pero estos pueden ser subclasificados en función a la expresión de HER2 y la proteína marcadora de proliferación Ki67. Los tumores que no expresan ER, PR o HER2, son conocidos como tumores de fenotipo triple negativo (TNP), a menudo se consideran equivalentes al subtipo basal, ya que pueden identificarse fácilmente con marcadores IHC que se usan actualmente en el uso clínico de rutina. Sin embargo, no todos los tumores TNP expresan citoqueratinas basales (CK). Se ha demostrado que la expresión de CK5 / 6 o del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) identifica con precisión los tumores de tipo basal clasificados mediante la expresión génica [37,38], y varios estudios publicados han utilizado estos marcadores para subclasificar los tumores TNP en un subgrupo basal central (CBP), que es equivalente al perfil basal de expresión y los cinco fenotipos negativos (5NP: RE RP, HER, CK5 / 6 y EGFR) (Tabla 1).

Subtipo	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	+/-	-	<14%
Luminal B	+	+/-	+/-	>14%
HER2+	-	-	+	>14%
TNP	-	-	-	>14%

Tabla 1. Clasificación del cáncer de mama basada en perfiles de expresión génica

La clasificación de este padecimiento ha sido de utilidad para comprender el comportamiento, pronóstico de cada subtipo así como su tratamiento, ya que la sobreexpresión de algunos marcadores ha sido de utilidad como blancos moleculares. Tal es el caso de los tumores que sobreexpresan HER2 cuyo tratamiento suele estar acompañado de Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HER2; o bien el uso de moduladores o inhibidores del receptor de estrógenos como tamoxifeno o fulvestrant, para aquellos tumores que sobreexpresen RH.

Características de las células tumorales

Hanahan, *et al.* en 2000, propusieron una serie de características que adquieren las células cancerosas durante el desarrollo tumoral (Figura 7), las cuales incluyen: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis, poseer inestabilidad del genoma y favorecer e inducir la inflamación, así como sobrevivir en ella [39]. Posteriormente Hanahan, *et al* añadieron dos características como: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune [40].

En este apartado se revisarán dos de estas características, las cuales son de gran relevancia para este trabajo.

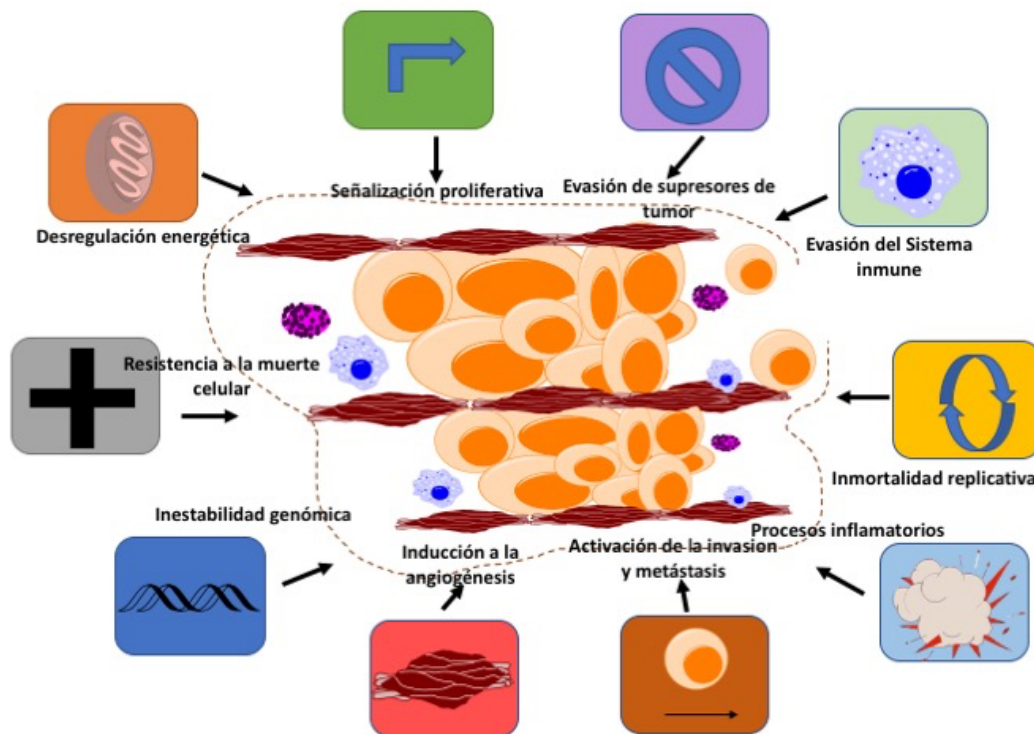


Figura 7. Características del cáncer.

Desregulación energética celular

Otto Warburg en la década de 1920, describió que las células tumorales capturan más glucosa y producen más lactato que las células normales [41]. Posteriormente Warburg demostró que incluso en presencia de abundante oxígeno, las células cancerosas producen mucho más lactato que los tejidos normales, lo que sugiere que estas células estaban degradando la glucosa mediante glucólisis aerobia [42]. Esta idea podría parecer contradictoria en células que están en constante proliferación, debido a que por esta vía se obtienen bajas concentraciones de ATP en comparación con la producción mediante fosforilación oxidativa. Por esta razón, Warburg originalmente planteó la hipótesis de que las tasas elevadas de glucólisis aeróbica en las células cancerosas eran atribuibles a la función deteriorada de las mitocondrias en estas células, requiriéndoles depender únicamente de la glucólisis para generar el ATP necesario para la supervivencia [43]. Sin embargo, se ha encontrado que las células tumorales tienen actividad mitocondrial y que aun así realizan glucólisis aeróbica. Se sugiere que esta reprogramación metabólica contribuye a la producción sostenida de moléculas intermediarias necesarias en diversas vías biosintéticas, incluidas las que generan nucleótidos y aminoácidos y la biosíntesis de las macromoléculas y organelos necesarios para ensamblar nuevas células [44,45].

A manera compensatoria del bajo rendimiento de ATP por glucólisis anaerobia, las células tumorales, aumentan la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1, que aumenta la captura de glucosa al citoplasma y de esta forma se mantienen los requerimientos energéticos y anabólicos de una célula transformada [43]. Esto puede observarse mediante la visualización no invasiva de la absorción de glucosa mediante tomografía por emisión de positrones (PET) con un análogo radiomarcado de glucosa (18F-fluorodeoxiglucosa, FDG) como reportero [46].

Inducción a la angiogénesis

Durante el desarrollo embrionario, se generan nuevos vasos sanguíneos (vasculogénesis) y a partir de esos vasos sanguíneos se puede generar aún mayor vasculatura (angiogénesis), con la finalidad de aportar los nutrientes y el oxígeno necesario para los tejidos en desarrollo [47]. Durante la adultez, la vasculogénesis se mantiene inactiva, mientras que la angiogénesis es transitoria y sólo actúa en ciertos procesos, como la curación de heridas [47]. Sin embargo, este proceso se mantiene activo durante el desarrollo tumoral, ya que las células cancerosas lo activan para su supervivencia, debido a que la vasculatura inicial es incapaz de irrigar de forma efectiva a las nuevas células [48].

La mala irrigación genera hipoxia y una disminución en el aporte de nutrientes, si bien esto podría causar la muerte en una célula normal, las células cancerosas desarrollan cambios en el proteoma orquestados por ciertos factores de transcripción, como el Factor Inducible a Hipoxia (HIF), que les permite sobrevivir a estas condiciones [48]. En ciertos tipos de cáncer, la sobreexpresión de HIF se ha relacionado con un pronóstico desfavorable y sus genes blanco aumentan sobre todo en el subgrupo de cáncer de mama triple negativo [49]. La estabilización de HIF, puede regular la transcripción de enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa, moléculas angiogénicas, factores de supervivencia y crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF], la angiotensina y el factor de crecimiento derivado de plaquetas [49,50].

Receptor relacionado a estrógenos alfa

El receptor relacionado a estrógenos alfa ($ERR\alpha$) pertenece a la familia de los receptores relacionados a estrógenos (ERRs) que consta de tres miembros: $ERR\alpha$ (NR3B1), $ERR\beta$ (NR3B2) y $ERR\gamma$ (NR3B3), para los cuales aún no se ha definido un ligando endógeno, por lo que forman parte de los receptores nucleares huérfanos.

La estructura general de la familia consta de cuatro dominios funcionales (Figura 8): el dominio N-terminal (NTD), dominio de unión a ADN (DBD), bisagra y dominio de unión a ligando (LBD) [51]. Debido a su homología con el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$), particularmente en DBD y LBD con 68 % y 37 % de identidad de aminoácidos respectivamente, se pensaba que $ER\alpha$ y $ERR\alpha$ compartían genes blanco, proteínas correguladoras, ligandos y sitios de acción [52]. Sin embargo, la identificación y caracterización de los genes blanco de ERRs permitió establecer a estos receptores como reguladores clave del metabolismo energético con funciones separadas a las de $ER\alpha$ [53].

$ERR\alpha$ regula genes del metabolismo celular, principalmente de la fosforilación oxidativa, biogénesis mitocondrial y ciclo de Krebs, mediante una secuencia de reconocimiento de medio sitio extendido que consta de nueve nucleótidos con la secuencia TNAAGGTCA, denominada ERRE (“ERR Response Element” o elemento de respuesta del receptor relacionado a estrógenos) [54]. Es mayormente expresado en órganos con alta demanda metabólica como corazón, intestino, riñón, músculo esquelético y tejido adiposo. El receptor $ERR\alpha$ se une al ADN como monómero, dímero y su actividad aumenta al interactuar con algunos coactivadores (Figura 9).



Figura 8. Mapa de la proteína ERR α . Extremo amino terminal (N), Extremo carboxilo terminal (C).

Recientes trabajos por Ghanbari *et al.* mediante ensayos de luciferasa y GST pull down assay sugirieron un agonista inverso fisiológico para ERR α y ERR γ : la estradienolona (ED) (17 beta-hidroxi-1,5-estradieno-3-ona) [55]. Además, demostraron que el tratamiento con ED disminuye la proliferación de células de cáncer de mama. Sin embargo, la actividad de ERR α y ERR γ en células cancerosas, parece tener un efecto opuesto en pacientes con cáncer de mama, ya que la expresión y actividad de ERR γ es sugerente de un buen pronóstico y supervivencia, mientras que ERR α se ha propuesto como marcador desfavorable en tumores sólidos [56,57], por lo que la actividad de este nuevo ligando aún debe ser más estudiado.

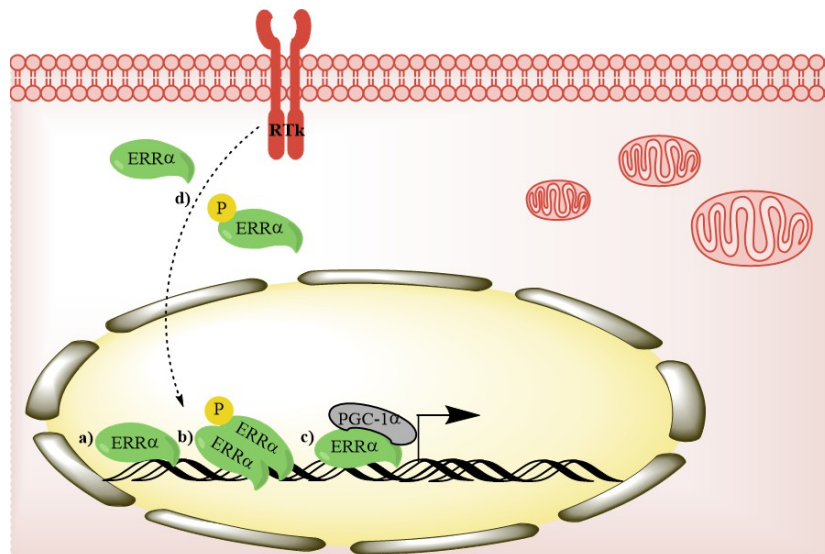


Figura 9. ERR α es un receptor nuclear huérfano. Tiene actividad transcripcional como a) monómero, b) dímero y puede fosforilarse mediante vías de señalización activadas por receptores de tipo tirosina cinasa (RTk). c) ERR α se une al coactivador PGC-1 α para aumentar su actividad transcripcional.

Receptor relacionado a estrógenos alfa en cáncer

Ariazi *et al* en 2002, sugirieron a ERR α como un biomarcador de pronóstico clínico desfavorable en cáncer de mama, mediante la comparación de los niveles de ARNm en células de tumor primario y células epiteliales mamarias normales, y correlacionando su expresión con la de Her2/ErbB2, un indicador del comportamiento agresivo del tumor [57]. Posteriores trabajos mediante análisis inmunohistoquímico, cuantificación de ARNm y perfiles de expresión génica en pacientes con cáncer de mama y convergen con Ariazi *et al* al relacionar la sobreexpresión de

ERR α con un mayor riesgo de recurrencia y menor supervivencia [58–60]. Se ha mostrado que la actividad transcripcional de ERR α aumenta al fosforilarse, por ejemplo mediante vías reguladas por receptores tirosina cinasa como EGF [61]. Además, se sugiere que Her2 también induce la fosforilación de ERR α a través de la señalización de MEK/MAPK y PI3K/Akt [62]. 15 a 25% de los tumores de mama tienen amplificado a Her2 lo que correlaciona con un subtipo agresivo de cáncer cuyo tratamiento podría complementarse mediante la inhibición de ERR α [63].

Por otro lado, durante el desarrollo tumoral, las células cancerosas sufren hipoxia, debido a que al crecer el tumor suele generar un déficit de vascularización y de forma temporal, los nuevos vasos sanguíneos se encuentran en desarrollo y el flujo sanguíneo es ineficiente. Las células cancerosas experimentan cambios genéticos adaptativos, mediados principalmente por el factor inducible a hipoxia (HIF), que es el regulador principal de la expresión génica hipóxica y la homeostasis del oxígeno [64]. Estos cambios en la expresión genética les permiten sobrevivir e incluso proliferar e invadir en ambientes hipóxicos [65,66].

En 2008 Ao *et al*, demostraron mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, la interacción entre ERR α y el heterodímero HIF-1 y HIF-2, sugiriendo que la interacción ocurre en el DBD de ERR α [67]. Además, la inhibición de ERR α en un modelo murino xenógrafo de cáncer de mama, disminuyó el tamaño del tumor y la angiogénesis tumoral [67]. Por otro parte, en un modelo murino xenógrafo de cáncer de próstata, la sobreexpresión de ERR α aumentó la densidad de la vasculatura tumoral, atribuyéndolo a la estabilización de HIF-1 α y, por lo tanto, a una mayor expresión de sus genes blanco [68]. Con lo anterior, podemos concluir que ERR α , además de contribuir a satisfacer la demanda metabólica de las células cancerosas, favorece la supervivencia en condiciones hipóxicas mediante la interacción con HIF-1, reflejándose principalmente, en angiogénesis y producción de ATP glucolítico anaerobio. Los trabajos mencionados permiten sugerir a ERR α como blanco molecular para el tratamiento del cáncer de mama. La inhibición de ERR α puede incluso servir para disminuir la actividad de HIF-1, que no ha podido inhibirse farmacológicamente de manera directa, a pesar de muchos esfuerzos.

Regulación de la actividad de ERR α

Para potenciar su actividad, ERR α requiere interactuar con proteínas coactivadoras (Figura 10c), utilizando principalmente a la familia de PGC-1 α (coactivador 1 α del receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma) y con miembros de la familia del coactivador del receptor de

esteroides (SRC). Sin embargo, a diferencia de otros receptores nucleares, la interacción entre ERRs y coactivadores es independiente de ligando [69,70]. El perfil de expresión de $ERR\alpha$ se correlaciona con el de PGC-1 α y PGC-1 β , que son importantes moduladores metabólicos porque coactivan diversos factores de transcripción que controlan genes del metabolismo. Se ha observado una capacidad de transcripción recíproca entre PGC-1 α y $ERR\alpha$, donde las dos proteínas son capaces de influir en las actividades transcripcionales del otro, sugiriendo que ambas proteínas orquestan la expresión de genes para el metabolismo oxidativo [71].

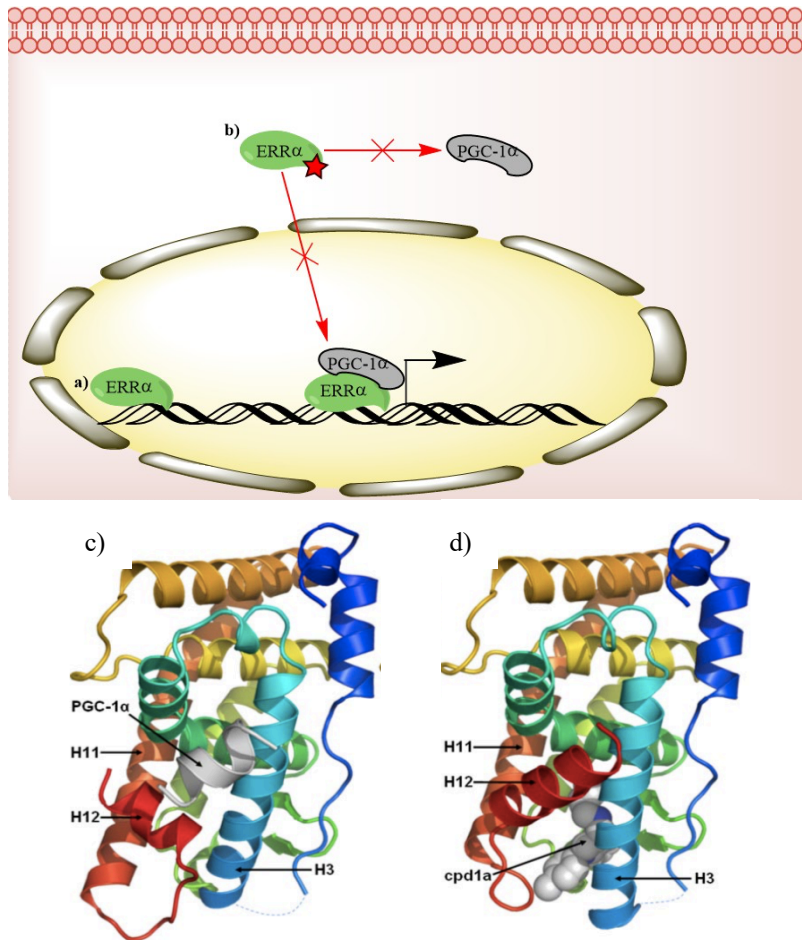


Figura 10. $ERR\alpha$ tiene actividad constitutiva independiente de ligando (a) un ligando sintético que disminuya su actividad se llama “agonista inverso” (representado con una estrella roja) (b). En (c) y (d) se aprecian los cambios estructurales del LBD de $ERR\alpha$ cuando une a su coactivador PGC-1 α (c, hélice gris) y cuando une a un agonista inverso (d, bolas blancas). Los agonistas inversos al unirse a $ERR\alpha$ impiden que el coactivador se una a $ERR\alpha$ mediante modificaciones estructurales del LBD, principalmente en la hélice 3 (H3) y desplazamiento de la hélice 12 (H12) que ocupa el sitio de unión para PGC-1 α . c) y d) tomados de Kallen et al. [72].

$ERR\alpha$ tiene actividad constitutiva independiente de ligando, sin embargo esta puede ser inhibida mediante compuestos sintéticos llamados agonistas inversos, los cuales impiden que el receptor se una a coactivadores (Figura 10a) [73–76]. El principal agonista inverso reportado para $ERR\alpha$ es

XCT790, una tiadiazol acrilamida sintética, que altera la señalización $ERR\alpha$ / $PGC-1\alpha$ y es inactivo contra el resto de los ERRs y contra el receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) [76]. Sin embargo, XCT790 se ha reportado también como un desacoplante mitocondrial, sugiriendo que podría disminuir el metabolismo aerobio, aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno y causar la muerte celular [77], por lo que no es un fármaco ideal para uso en humanos debido a su alto potencial toxicidad. Se han desarrollado otros compuestos con actividad de agonistas inversos contra $ERR\alpha$, con fines terapéuticos, como ciclohexilmetil- (1-p-tolil-1H-indol-3-ilmetil) -amina (compuesto 1a) (Figura 10d) [78] y una tiazolidinediona a base de diaril éter (compuesto 29) [79], los cuales se han cristalizado con el LBD de $ERR\alpha$ (código PDB 2PJL y 3K6P, respectivamente). En ambos compuestos, la unión con $ERR\alpha$ genera cambios conformacionales significativos en el bolsillo de unión al ligando del receptor y rotaciones de algunas cadenas laterales, como el desplazamiento de Phe328 (Hélice 3) y de Phe510 (Hélice 12), impidiendo que el coactivador $PGC-1\alpha$ se una al receptor [80]. Mediante ensayos de FRET y reportero de luciferasa, se ha demostrado afinidad y efecto inhibitorio del compuesto 29 en $ERR\alpha$, además de ser selectivo frente a otros receptores nucleares, incluyendo miembros de la familia ERR [81]. El compuesto 29 muestra excelentes propiedades farmacocinéticas en modelos animales. Además el tratamiento con el compuesto 29 en modelos de ratón con obesidad inducida por dieta y en modelo monogénico de rata con diabetes tipo II, mejora significativamente la sensibilidad a la insulina, la tolerancia a la glucosa y disminuye los niveles de triglicéridos en suero, por lo que se propone como agente potencial para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 [80]. Sin embargo, no se han encontrado reportes que evalúen al compuesto 29 como antineoplásico. Con lo anterior podemos resumir que la inhibición de $ERR\alpha$ puede ser útil en el tratamiento de cáncer de mama, pero a pesar de que existen compuestos inhibidores de $ERR\alpha$, estos no pueden usarse en la clínica por lo que resulta útil buscar otros inhibidores de una forma rápida y segura como el reposicionamiento de fármacos.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de mama es un grave problema de salud pública con alto costo humano, social y económico para el país, ya que constituye una neoplasia maligna frecuente y con alta morbi-mortalidad en mujeres mexicanas. A pesar de existir variedad de tratamientos, aún alrededor de un tercio de los casos no son curables con los esquemas actuales y reaparecen en los

siguientes años a pesar de tratamiento. Entonces, es importante identificar más blancos de tratamiento y desarrollar nuevos antineoplásicos dirigidos contra las características del tumor. $ERR\alpha$ es un atractivo blanco de tratamiento pues su inhibición ha demostrado disminuir la capacidad proliferativa, invasiva y metastásica del cáncer de mama. $ERR\alpha$ se encuentran en una encrucijada que le permite adaptar el metabolismo en respuesta tanto a las señales proliferativas como al aporte de nutrientes y oxígeno, para propiciar la biosíntesis de células tumorales, la formación de nueva vasculatura y para aumentar la viabilidad celular en hipoxia y metástasis.

Dado que el metabolismo es distinto en células cancerosas que en células normales, se han sugerido blancos metabólicos en el tratamiento del cáncer. $ERR\alpha$ parece ser un blanco metabólico adecuado ya que su inhibición revierte la desregulación energética celular, impide la adaptación de los tejidos más proliferativos a la hipoxia y limita la generación de intermediarios para la biosíntesis de nuevas células tumorales. Por lo mismo, esperamos que la inhibición de $ERR\alpha$ sea bien tolerada por las células poco proliferativas que no requieren esta adaptación. Los inhibidores de $ERR\alpha$ podrían funcionar como terapia sistémica neoadyuvante o adyuvante.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel regulatorio de $ERR\alpha$ sobre el metabolismo energético, sugiere que su inhibición podría impedir la adaptación metabólica de las células tumorales, incluso en condiciones de hipoxia. La inhibición de $ERR\alpha$ podría servir para atacar en especial a los subtipos de cáncer de mama más agresivos como el que tiene sobreexpresado Her2/Erb2 y el triple negativo que tienen sobreexpresado a HIF. La búsqueda de agonistas inversos de $ERR\alpha$ mediante acoplamiento molecular *in silico*, resultaría de utilidad para reposicionar fármacos y de esta forma obtener una terapia con compuestos de toxicidad y farmacocinética conocida, en menor tiempo y con menor costo de desarrollo, para complementar el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, en particular, aquellas con cáncer agresivo para las que hay opciones terapéuticas limitadas.

HIPOTESIS

El análisis por acoplamiento molecular *in silico* permitirá identificar nuevos compuestos afines a $ERR\alpha$, con energía de unión similar a los compuestos ya reportados como agonistas inversos del

receptor. Los fármacos identificados, inhibirán la actividad transcripcional del receptor y la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama.

OBJETIVOS GENERALES

- Establecer un protocolo para identificar agonistas inversos de ERR α mediante tamizaje por acoplamiento molecular ("Docking") con 8215 compuestos disponibles comercialmente y probados en humanos.
- Evaluar el efecto de los mejores compuestos de la predicción *in silico*, sobre la actividad transcripcional del receptor ERR α y sobre la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama, para su posible reposicionamiento farmacológico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar las estructuras cristalográficas reportadas para ERR α , a fin de identificar la(s) ideal(es) para ejecutar el tamiz molecular *in silico* y validar su uso mediante docking con ligandos conocidos.
2. Empleando tamiz molecular *in silico* (docking) con 8215 compuestos, identificar aquellos con afinidad por ERR α mediante el análisis de la energía de unión.
3. Comparar la estructura de ERR α con ligandos del tamiz contra la estructura con agonistas inversos conocidos, en busca de compuestos con posible actividad inhibitoria y a fin de identificar determinantes estructurales para la inhibición farmacológica de ERR α .
4. Obtener el plásmido control ERR α (-) para completar un sistema de plásmidos para ensayos de actividad transcripcional de ERR α con luciferasa como gen reportero.
5. Estandarizar las condiciones para el ensayo de actividad transcripcional de ERR α con reportero de luciferasa.
6. Evaluar el efecto de al menos 5 compuestos seleccionados, sobre la actividad transcripcional de ERR α , mediante un reportero de luciferasa.
7. Evaluar el efecto de compuestos sugestivos de comportarse como agonistas inversos de ERR α sobre la proliferación en líneas celulares representativas de los subtipos del cáncer de mama mediante el equipo de análisis celular InCuCyte ZOOM.

Metodología

Análisis in silico

A partir de la base de datos Protein Data Bank (PDB) se analizaron y se reconstruyeron los modelos cristalográficos del Dominio de Unión a Ligando (LBD) de $ERR\alpha$ (1XB7, 2PJL, 3D24, 3K6P) mediante los programas UCSF Chimera y Modeller 9. Las estructuras resultantes fueron analizadas en el programa de visualización UCSF Chimera y utilizadas para un tamiz computacional con los compuestos ya reportados con afinidad y actividad de agonista o agonista inverso, y de esta forma identificar el mejor modelo cristalográfico para su utilización en los siguientes tamices. El modelo cristalográfico seleccionado, fue preparado para su utilización en el docking en el programa UCSF DOCK6 version 6.8, utilizando como ligandos los compuestos de los subconjuntos de ligandos ZMD (5291 compuestos) y ZDD (2924 compuestos) de ZINC [82], las cuales incluyen compuestos disponibles comercialmente aprobados por la FDA como nutraceuticos, fármacos, suplementos y metabolitos primarios. Durante el análisis computacional se incluyeron como controles positivos los compuestos descritos como agonistas y agonistas inversos de $ERR\alpha$. Los resultados obtenidos fueron visualizados en UCSF Chimera y se seleccionaron aquellos con pose y energía de unión similar a los compuestos controles para realizar un segundo docking ciego en el programa VINA con 100 de exhaustividad. Los resultados obtenidos fueron nuevamente visualizados en UCSF Chimera para seleccionar a aquellos compuestos que se unieran exclusivamente al LBD, que tuvieran una pose y energía de unión similar a los compuestos controles.

Obtención de bacterias quimiocompetentes

Bacterias *E. coli* DH5 alfa fueron cultivadas en 10 mL de agar LB (Luria-Bertani) en condiciones de esterilidad, y posteriormente fueron incubadas a 37 °C durante 18 horas. Del crecimiento obtenido del inóculo se eligió una colonia, la cual fue inoculada en 5 mL de medio líquido LB en condiciones de esterilidad, y posteriormente se incubó en agitación a 37 °C durante 18 horas. Subsecuentemente se tomó 1 mL del medio con crecimiento, se inoculó en 100 mL de medio líquido LB y fue incubado a 37 °C en agitación. El medio fue monitoreado hasta que llegó a una densidad óptica de 0.6. El cultivo fue colocado en hielo y posteriormente se centrifugó a 4 °C durante 7 minutos a 4000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante y a la pastilla (bacterias) se le añadieron 5 mL de $CaCl_2$ 0.1 M. Las bacterias fueron mantenidas en hielo durante 10 minutos.

Posteriormente se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 2500 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. A la pastilla se le añadió 1mL de CaCl_2 0.1 M frío y el producto que corresponde a las bacterias competentes, fue alicuotado y almacenado a -80°C . Estas bacterias se usaron para replicar los plásmidos para la evaluación transcripcional de $\text{ERR}\alpha$ con el sistema de reportero que a continuación se explica.

Sistema de reportero transcripcional de luciferasa.

Para evaluar el efecto de los fármacos identificados *in silico*, sobre la actividad transcripcional de $\text{ERR}\alpha$, se utilizó un sistema de gen reportero de luciferasa, en el que se evaluaron tres combinaciones de plásmidos transfectados en líneas celulares de cáncer de mama. El ensayo de luciferasa se basó en medir por luminometría, la actividad de la enzima luciferasa expresada bajo el control transcripcional de $\text{ERR}\alpha$. Para ello requerimos un plásmido principal que expresa la luciferasa bajo el control de elementos de respuesta que unen $\text{ERR}\alpha$, más otros plásmidos que sirvieron de distintos controles y normalizadores. Los plásmidos que se usaron se muestran en la Tabla 2, y las combinaciones usadas se explican con todo detalle en los resultados. La mayoría de estos plásmidos se compraron para el proyecto o se obtuvieron por donación. Sin embargo, al iniciar el proyecto teníamos un plásmido que expresaba la proteína $\text{ERR}\alpha$, pero no teníamos un control del mismo plásmido sin la secuencia de $\text{ERR}\alpha$ ($\text{pERR}\alpha(-)$), por lo que tuvimos que construirlo.

Obtención de plásmido control: $\text{ERR}\alpha(-)$

Con la finalidad de obtener un plásmido sin la secuencia condificante de $\text{pERR}\alpha(-)$, el cual serviría como uno de los controles para el ensayo de luciferasa, se realizó la siguiente estrategia: a partir del plásmido pCMV flag ERR alpha (código Addgene: 10975) se realizó una digestión durante 120 minutos a 37°C con $0.5\ \mu\text{L}$ de dos endonucleasas de corte romo: Eco53KI (New England Biolabs) y EcoRV (Fermentas), cuyos sitios de corte flanquean el inserto de $\text{ERR}\alpha$ en el plásmido original. Posteriormente se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8 %, utilizando amortiguador TAE (Tris 39 mM, ácido acético 18 mM, EDTA 1.3 mM, pH 8) aplicando un voltaje de 80 V durante 40 minutos. El ADN se tiñó con una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. El producto de 4236 pb que corresponde al plásmido esqueleto, es decir el plásmido sin la secuencia de $\text{ERR}\alpha$ fue

cortado del gel purificado con el kit Monarch® DNA Gel Extraction Kit (New England Biolabs) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Figura 11). Finalmente se realizó una religación con la enzima T4 DNA Ligase (Promega) a 16 °C durante 18 horas. El producto de esta religación fue transformado en bacterias DH5 α , purificado y comprobado mediante digestiones enzimáticas dobles y PCR.

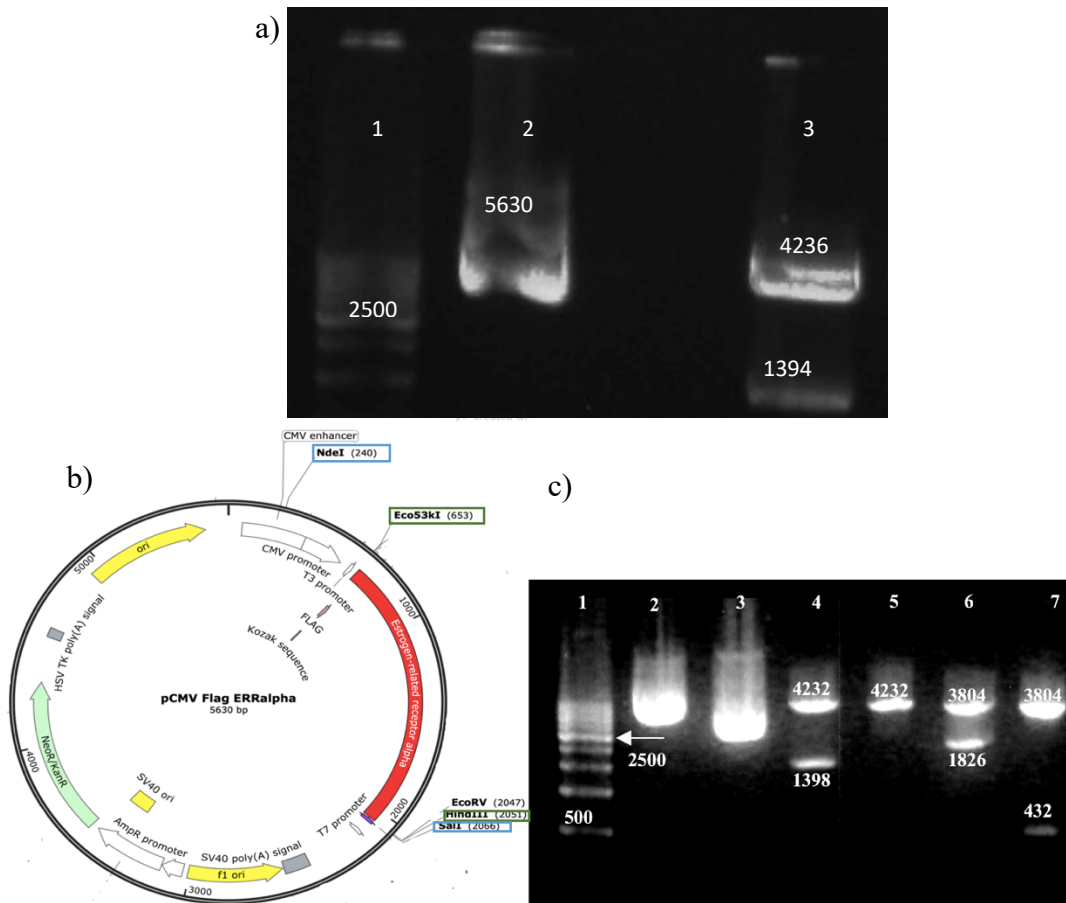


Figura 11. a) Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8 % de: 1. marcador de pares de bases, 2. plásmido pCMV Flag ERRalpha y 3. pCMV Flag ERRalpha bajo el tratamiento enzimático de ECO53KI y ECORV (el fragmento correspondiente a 4236 pb fue el cortado). **b) Mapa del plásmido pCMV Flag ERRalpha.** En recuadros del mismo color se muestra los pares de enzimas utilizadas en las digestiones dobles para la comprobación del plásmido. **c) Patrones de restricción de la construcción pCMV ERR α (-) comparada con pCMV Flag ERRalpha.** En el carril 1 se muestra el marcador molecular en pares de bases, en 2 y 3 se muestran los plásmidos pCMV Flag ERRalpha y pCMV ERR α (-) sin tratamiento enzimático (sin digestión). En los carriles 4 y 5 se muestran los plásmidos en el mismo orden digeridos con las enzimas Eco53KI y HindII. El plásmido pCMV ERR α (-) no libera el inserto (5) que se observa para pCMV Flag ERRalpha (4). En 6 y 7 se muestran las bandas obtenidas tras la digestión por NdeI y SalI de los plásmidos en el mismo orden. El fragmento liberado en el segundo plásmido es más pequeño, como se esperaba porque se le quitó la secuencia de ERR α .

PCR

Con la finalidad de comprobar el producto obtenido de la religación para obtener el plásmido sin la secuencia codificante de ERR α (pERR α (-)), los plásmidos pCMV flag ERR alpha y pERR α (-) fueron amplificados con los primers: Forward 5'GGGAAACGCCTGGTATCTTT3' y Reverse 5'GAAATTTGTGATGCTATTGC3' de la casa comercial T4 oligo con PCR Master mix (Thermo Fisher Scientific) y agua libre de nucleasas. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 0.8 %

Se obtuvieron amplificaciones tanto en pCMV flag ERR alpha y pERR α (-), ya que ambos plásmidos cuentan con la secuencia complementaria de los primers, sin embargo, se obtuvo un producto de mayor tamaño en pCMV flag ERR alpha, debido a que este cuenta con 1394 pb más que pERR α (-) (Figura 12).

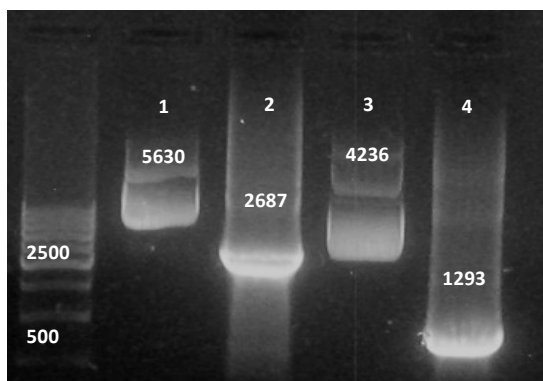


Figura 12. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8 % de: 1. marcador de pares de bases, 2. plásmido pCMV Flag ERRalpha, 3. producto de PCR usando como molde a pCMV Flag ERRalpha, 4. producto de PCR usando como molde a pERR α (-).

Transformación de bacterias DH5 alfa quimiocompetentes por choque térmico.

Para replicar los plásmidos a utilizar en el ensayo de luciferasa, se realizó transformación bacteriana con 50 μ L de una suspensión con *E. coli* DH5 alfa químicamente competentes y 1 μ L con ADN plasmídico, manteniéndose en hielo por 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C durante 45 segundos y después 4 $^{\circ}$ C por 5 minutos. Posterior a esto, se agregaron 800 μ L de medio LB y las bacterias fueron mantenidas a 37 $^{\circ}$ C en agitación durante una hora. La suspensión obtenida fue inoculada en agar LB/antibiótico e incubada a 37 $^{\circ}$ C por 16 horas.

Nombre clave	Plásmido/ procedencia	Inserto	Tamaño (pb)	Resistencia a antibióticos	Función en el ensayo de luciferasa
pRL-SV40	pRL-SV40 (Promega)	Expresión de luciferasa (<i>Renilla reniformis</i>)	3705	Ampicilina	Normalizador
pRL-TK	pRL-TK (Promega)	Expresión de luciferasa (<i>Renilla reniformis</i>)	4045	Ampicilina	Normalizador
pERRα (+)	pCMV flag ERR alpha (AddGene, 10975)	Expresión de ERR α	5 630	Kanamicina	Problema
pERRα (-)	pCMV flag ERR alpha (-)	Sin inserto	4236	Kanamicina	Control
p3XERRE	3xERRE-luciferase (AddGene, 37851)	3 copias de ERRE río arriba del promotor SV40	5 071	Ampicilina	Problema
3xERRE-luciferase (-)	pGL3-promotor (Promega)	Sin inserto	5 516	Ampicilina	Control

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el ensayo de luciferasa.

Purificación de ADN plasmídico

Colonias aisladas obtenidas del protocolo de transformación, fueron inoculadas en 5 mL de medio LB/antibiótico a 37 °C con agitación durante 18 horas. Cuatro mL de la suspensión bacteriana, fueron centrifugados a 6000 r.p.m por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida vigorosamente en 100 μ L de solución I y posteriormente se agregaron

150 μ L de la solución 2, invirtiendo el tubo por 2 minutos. Finalmente se agregó la solución 3 y la mezcla fue centrifugada a 14 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y mezclado con 1 mL de etanol absoluto frío para posteriormente ser centrifugado a 14 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y la pastilla se resuspendió en 1 mL de etanol al 70 % frío para nuevamente ser centrifugado a 14 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 μ L de agua libre de nucleasas.

Los productos obtenidos, se sometieron a un corrimiento electroforético y a una digestión enzimática.

Una vez comprobado el plásmido por el corrimiento electroforético y la digestión enzimática, el cultivo bacteriano restante (1 mL), se inoculó en 500 mL de medio LB/antibiótico durante 18 h a 37 °C en agitación. Posteriormente se realizó la purificación del plásmido mediante el Kit Plasmid DNA purification (Macherey-Nagel) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Figura 13).

El producto obtenido fue cuantificado en un Nanofotómetro.

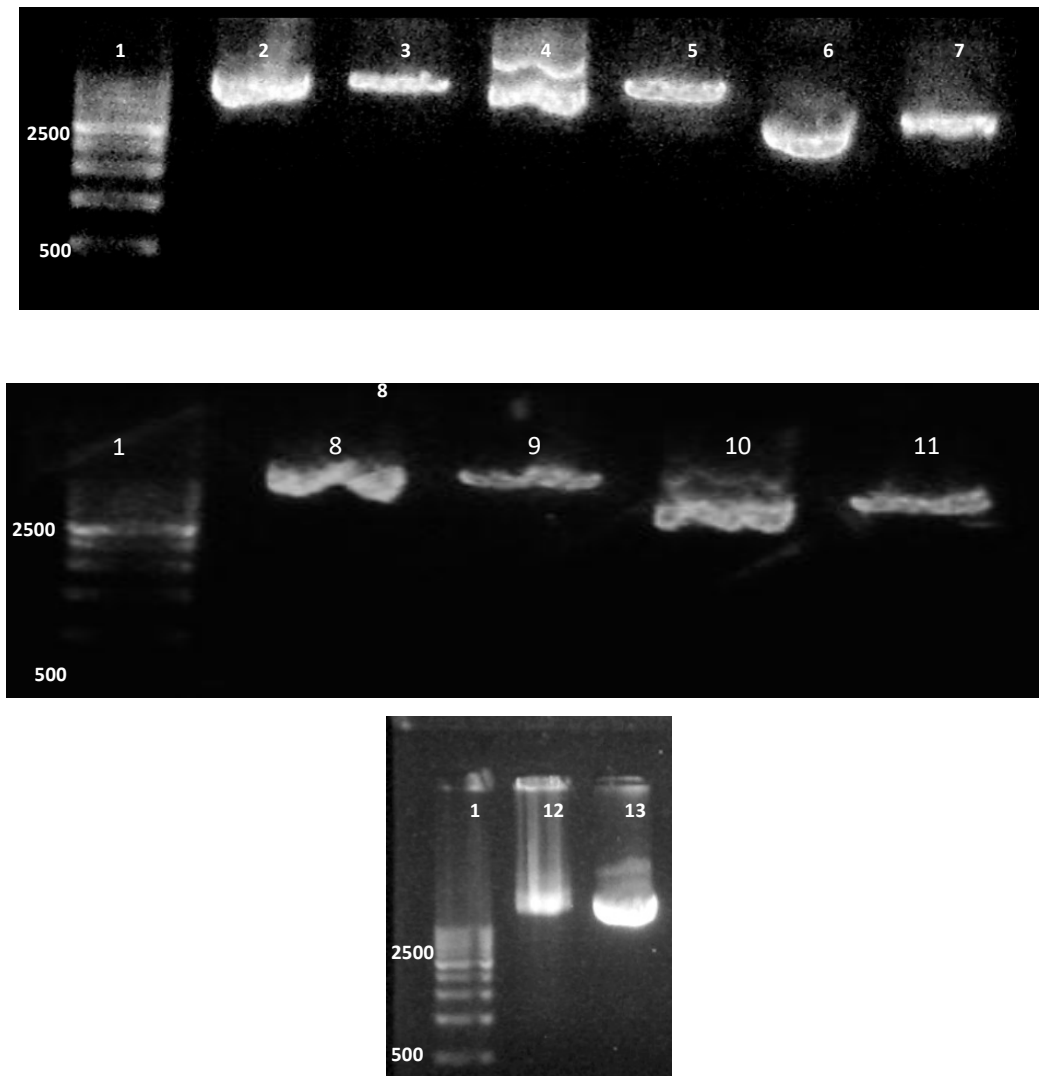


Figura 13. Producto de las maxiprep de los plásmidos utilizados en los ensayos de luciferasa. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.8%. En el carril 1) se muestra el marcador de pares de bases (pb), observándose una banda más intensa correspondiente a 2500 pb y una última de 500 pb. 2) Producto de maxiprep del plásmido 3XERRE Luciferase. 3) Plásmido 3XERRE Luciferase linearizado con la enzima Hind III (5071 pb). 4) Producto de maxiprep del plásmido pGL3 Promotor. 5) Plásmido pGL3 Promotor linearizado con la enzima Hind III (5516). 6) Producto de maxiprep del plásmido pGL4.72. 7) Plásmido pGL4.72 linearizado con la enzima Bgl II (3704 pb). 8) Producto de maxiprep del plásmido ERR α (+). 9) Plásmido ERR α (+) linearizado con la enzima Hind III (5630 pb). 10) Producto de maxiprep de plásmido ERR α (-). 11) Plásmido ERR α (-) linearizado con la enzima Hind III (4232 pb). 12) Plásmido pRL-TK linearizado con la enzima Hind III (4045 pb). 13) Producto de maxiprep de plásmido pRL-TK

Cultivo celular

Para evaluar los fármacos identificados en el análisis *in vitro* se realizaron diferentes técnicas usando tres diferentes líneas celulares, cuyas características se muestran a continuación:

Línea celular	Procedencia	Características celulares	Medio de cultivo	Expresión de receptores
MDA-MB-231	ATCC	Células adherentes adenocarcinoma de origen humano	Medio DMEM (Sigma-Aldrich)	Triple negativo (ER-, PR-, HER2+)
SK-BR-3	ATCC	Células adherentes adenocarcinoma de origen humano con sobreexpresión de HER2	McCoy 5 ^a (Sigma-Aldrich)	(HER2+)
MCF7	Donación	Células adherentes adenocarcinoma de origen humano con sobreexpresión de receptor de estrógenos	MEM con 10 µg/mL de insulina recombinante humana (Sigma-Aldrich)	ER (+)

Tabla 3. Líneas celulares utilizadas en el análisis in vitro.

Las tres líneas fueron cultivadas con suero fetal bovino (SFB) a 37 °C sin antibiótico y 5 % de CO₂ a menos que se indique lo contrario.

Ensayo de luciferasa

Las células SK-BR-3 y MDA-MB-231 obtenidas de ATCC con código HTB-30 y HTB-26 respectivamente, fueron sembradas en placa de 24 pozos (40 mil células/pozo) y mantenidas a 37 °C y 5% de CO₂, en los medios McCoy 5A y DMEM (Sigma-Aldrich) respectivamente, suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10 %. Después de 24 horas, el medio fue retirado

y las células fueron transfectadas con lipofectamina 3000 (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con los plásmidos que corresponden a cada sistema (Tabla 4) 20 horas posteriores a la transfección, el medio de transfección fue reemplazado por medio suplementado y el tratamiento correspondiente durante 24 horas. Tras este tiempo se realizó la lisis de las células para realizar la lectura de emisión de luz por las enzimas reporteras mediante el sistema de Dual-Luciferase Reporter Assay en el luminómetro GloMax® 20/20.

Reactivo	Cantidad por pozo (placa de 24 pozos)
Opti-MEM™ I medium	50 µL
Lipofectamine 3000 reagent	0.5 µL
P3000™ reagent	0.5 µL
Plásmidos problema	0.5 µg / µL
Plásmidos control	0.5 µg / µL
Plásmidos normalizador	En función a la estandarización

Tabla 4. Cantidad de los reactivos utilizados en el protocolo de transfección.

Ensayo de proliferación

Se sembraron 8000 y 10,000 células/ pozo de las líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-231 respectivamente en una placa de 96 pozos en 100 µL de medio suplementado, y posteriormente se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂. Después de 24 horas posterior a la siembra se añadió a los pozos medio con los compuestos seleccionados disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) alcanzando un volumen final de 200 µL/pozo; mientras que las células control se trataron con un volumen equivalente del vehículo. La placa fue incubada durante 96 horas en el sistema Incucyte Zoom (Essen BioScience, Ann Arbor, MI) y el porcentaje de confluencia fue determinado de forma automática por el equipo, a partir de imágenes tomadas cada cuatro horas con objetivo 20x.

Ensayo de clonogenicidad

Se sembraron 8000 y 10,000 células/ pozo de las líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-231 respectivamente en una placa de 96 pozos en 100 µL de medio suplementado, y posteriormente incubadas a 37 °C y 5% de CO₂. Después de 24 horas se añadió a los pozos medio con los compuestos seleccionados disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), alcanzando un volumen final de 200 µL/pozo; mientras que las células control se trataron con un volumen equivalente de medio

con vehículo. Posterior a 96 horas de incubación, el tratamiento fue retirado de los pozos y las células fueron fijadas con paraformaldehído. Una vez fijadas, se retiró el paraformaldehído para agregar una solución de cristal violeta 4 %. Posterior a la tinción, el colorante fue removido y la placa se dejó secar durante 1 hora 30 minutos para agregar una solución de ácido acético al 4 % y analizar la absorbancia del producto obtenido en el espectrofotómetro Zinergy a 590 nm.

Ensayo de inmunofluorescencia

Se sembraron 10,000 células/ pozo de la línea celular SK-BR-3 en una placa de 96 pozos en 100 μ L de medio McCoy5a suplementado con SFB y posteriormente incubadas a 37 °C y 5% de CO₂. 24 horas posterior a la siembra el medio de cultivo fue retirado y fue añadido un medio de cultivo bajo en nutrientes (medio simple optimizado de potasio KSOM), manteniendo a las células en estas condiciones durante 24 horas. Posteriormente el medio de cultivo fue retirado y la monocapa de células fue lavada con PBS y después fue fijada con paraformaldehído al 4 %, continuando con la adición de una solución de 100 μ L/pozo de buffer de fosfatos (PBS)/TRITON X100 al 25 % durante 10 minutos para permeabilizar las células. Después se añadieron 100 μ L/pozo de una solución de bloqueo (PBST-BSA 1%) durante 1 hora. Se continuó con la adición del anticuerpo primario dirigido contra ERR α (R&D systems, PP-H5844-00) incubándolo por 16 horas a 4 °C. Posteriormente la solución que contenía el anticuerpo fue retirada y las células fueron lavadas por tres veces con una solución de PBST. Después se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a AlexaFluor 488. La solución fue retirada y las células lavadas por tres veces. Finalmente se realizó una contratinción con Hoescht 33342 para teñir ácidos nucleicos. Las células fueron visualizadas en un microscopio invertido AxioObserver equipado con sistema de epifluorescencia e iluminación estructurada Apotome 2.0. y se analizaron utilizando los objetivos 20X y 40X mediante el software Zen Black.

Análisis estadístico

A excepción de los ensayos de inmunofluorescencia, todos los experimentos se hicieron de forma independiente por triplicado, analizándolos mediante Anova de una vía en el programa Graphpad Prism 6.

Esquema de trabajo general

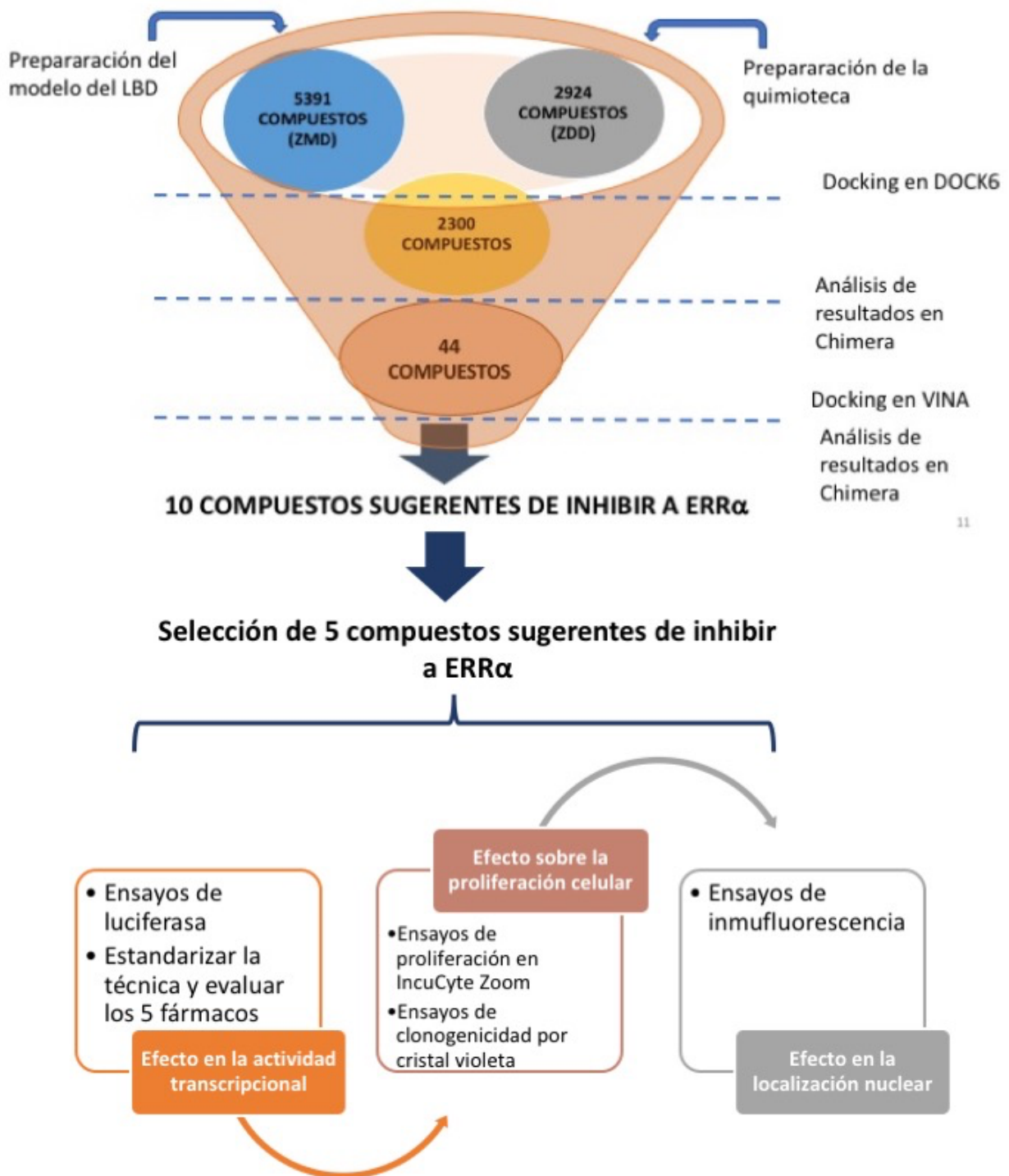


Figura 14. Esquema de trabajo general del proyecto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis in silico

En algunas estructuras cristalográficas de ERR α el sitio de unión a ligando (LBP) podría no estar formado, por lo que la elección del modelo cristalográfico de ERR α a utilizar en el presente estudio fue trascendental. Para elegir el modelo cristalográfico ideal para los dockings del tamiz, lo primero que se realizó en este proyecto fue un docking ciego en VINA de 6 compuestos control: Kaempferol, XCT790, Compuesto 1a, Compuesto 29, Troglitazona, AM251 (cuya unión con ERR α ha sido reportada [83]), contra las 4 estructuras reportadas del LBD de ERR α , reconstruidas para incluir residuos aminoacídicos faltantes. A partir de esta reconstrucción se obtuvo un modelo de cada estructura reportada, a excepción de 2PJL de la cual se seleccionaron dos modelos de la reconstrucción. Los modelos obtenidos fueron nombrados como m1 previo a su código PDB y en el caso de los modelos de 2PJL se añadió c1 o c2.

En la tabla 5 se describen las características de las estructuras del LBD de ERR α reportadas en PDB.

Código PDB	Ligando con el cual fue cristalizado	Resolución	Longitud de la secuencia	Mutaciones	Referencia
1XB7	PGC-1 α (12 aminoácidos)	2.5 Å	247	N-terminal polihistidina	[84]
2PJL	Compuesto 1a.	2.3 Å	247	C325S	[72]
3K6P	Compuesto 29	1.996 Å	248	N-terminal polihistidina	[85]
3D24	PGC-1 α (22 aminoácidos).	2.11 Å	253	N-terminal polihistidina	[86]

Tabla 5. Características de los modelos cristalográficos reportados en PDB del LBD de ERR α

Los dockings de las estructuras de ERR α sin ligando y con coactivador (3D24 y 1XB7), llamadas apoERR α [87], muestran que los ligandos control no se unen en el LBP (Figura 15a). Estos

resultados convergen con lo que reporta Kallen *et al*, quienes propone que en la conformación apoERR α , el LBP está prácticamente ocupado por las cadenas laterales de ERR α y que el volumen disponible para ligando es de sólo 100 Å, lo que sugiere que los ligandos sólo podrían unirse si F328 cambiara drásticamente su conformación [87]. Por el contrario, los ligandos control fueron capaces de unirse al LBP de estructuras provenientes de cristales con agonistas inversos (2PJL y 3K6P), en los que el LBP muestra cambios conformacionales y rotaciones de la hélice (H3) con el desplazamiento de la cadena lateral de F328 y E311, conduciendo a una ampliación del LBP para que los ligandos puedan unirse [72,85].

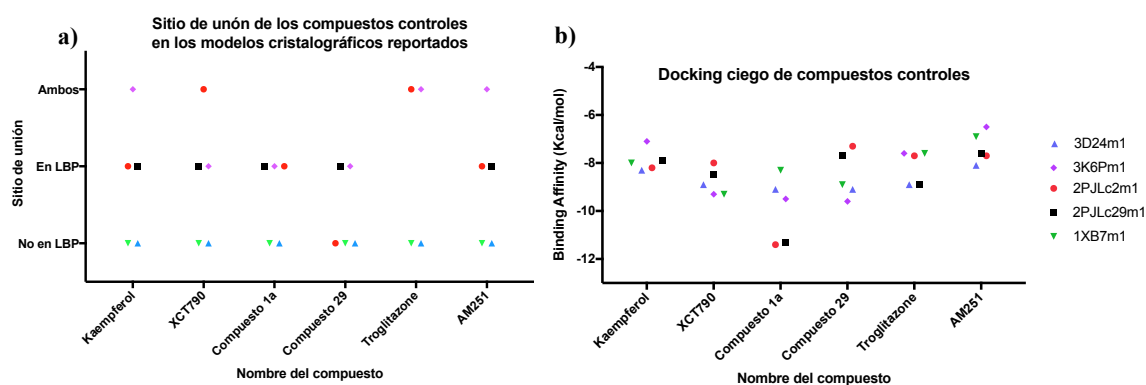


Figura 15. Análisis de la unión de seis compuestos control con distintos modelos cristalográficos del LBP de ERR α para elegir el modelo ideal para el tamizaje masivo de compuestos. a) Análisis estructural del docking ciego en VINA con los compuestos controles y los modelos cristalográficos del LBD de ERR α para determinar su sitio de unión. b) Afinidad de unión de los compuestos controles en los modelos cristalográficos del LBD de ERR α mediante docking ciego en VINA. Las notaciones posteriores a los códigos PDB, corresponden a los modelos obtenidos en la reconstrucción del LBD.

La energía de unión fue similar entre todos los modelos, sólo mejorando entre 2PJL y el compuesto 1a, con el que fue cristalizado (Figura 15b). Con base en estos resultados, se eligió la estructura 2PJL para los dockings de tamizaje de compuestos problema.

Como siguiente paso para buscar fármacos que funcionen como posibles inhibidores de ERR α , se realizó un docking flexible con el modelo elegido, 2PJL contra 8215 compuestos de las bases de datos ZMD y ZDD de Zinc12, en UCSF Dock6. Se obtuvieron 4608 y 2314 respectivamente con energía de unión similar a los compuestos controles (Figura 16). Estos resultados fueron analizados en el programa de visualización UCSF Chimera para identificar aquellos que se unieron y ocuparon el LBD de forma similar a los controles. Los 44 ligandos con mejor posición y energía de unión fueron analizados además en un docking ciego por VINA (Figura 17) y nuevamente

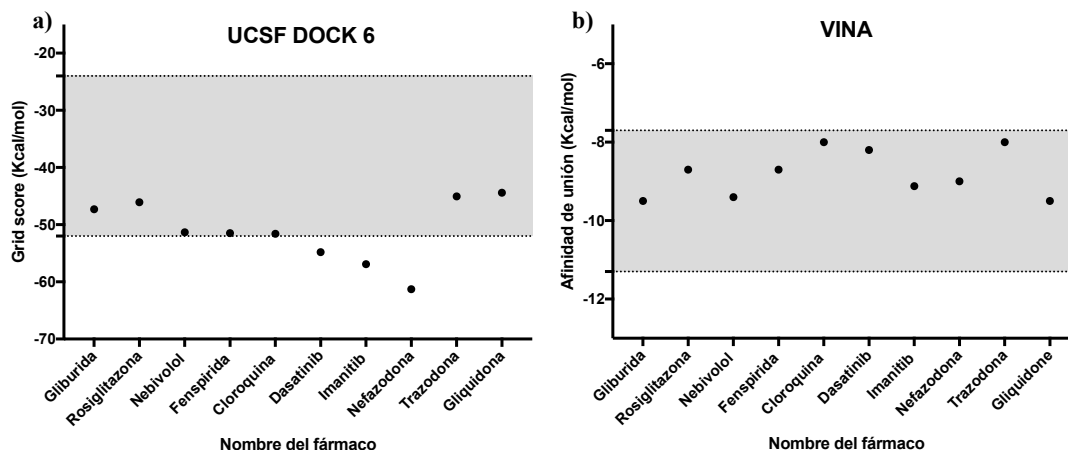


Figura 18. Las gráficas muestran a los diez fármacos que presentaron energía de unión similar al conjunto de inhibidores reportados para $ERR\alpha$ (controles positivos). El área sombreada representa el intervalo de energía de unión de los controles positivos: a) -28.3 a -51 Kcal/mol, utilizando el programa computacional UCSF DOCK6, y b) -7.7 a -11.3 Kcal/mol utilizando el programa computacional VINA.

El análisis estructural de los compuestos identificados muestra que los fármacos que tienen mejor energía de unión, son aquellos que presentan 3 o 4 anillos carbonados, de los cuales 2 o 3 son anillos aromáticos (Figura 19a y b), característica que también presentan los compuestos controles. Esto sugiere que dichas estructuras podrían ser necesarias para interactuar con el LBP hidrofóbico de $ERR\alpha$, principalmente mediante interacciones de tipo π y sigma como ya se describió para los compuestos controles [72,85]. Por otro lado, se evaluó el descriptor FragFp que permite comparar un grupo de compuestos contra un compuesto firma a partir de un diccionario de 512 fragmentos de estructuras predefinidas, otorgando un valor en escala del 0 a 1, donde la similitud al compuesto firma es directamente proporcional al valor otorgado. Dentro de nuestro grupo de compuestos, se obtuvieron valores FragFP de 0.25 a 0.5 al compararlos con XCT790 y de 0.3 a 0.45 al compararlos con compuesto 1a. Estos valores se aprecian inclusive en los compuestos controles, donde los más similares son XCT790 y compuesto 29 con un valor de 0.53 (Figura 19c). Entonces, aunque los fármacos identificados no muestran una gran similitud con los compuestos controles de acuerdo al descriptor FragFp, si presentan interacciones similares a los compuestos controles con los residuos aminoacídicos que conforman el LBP (Figura 20).

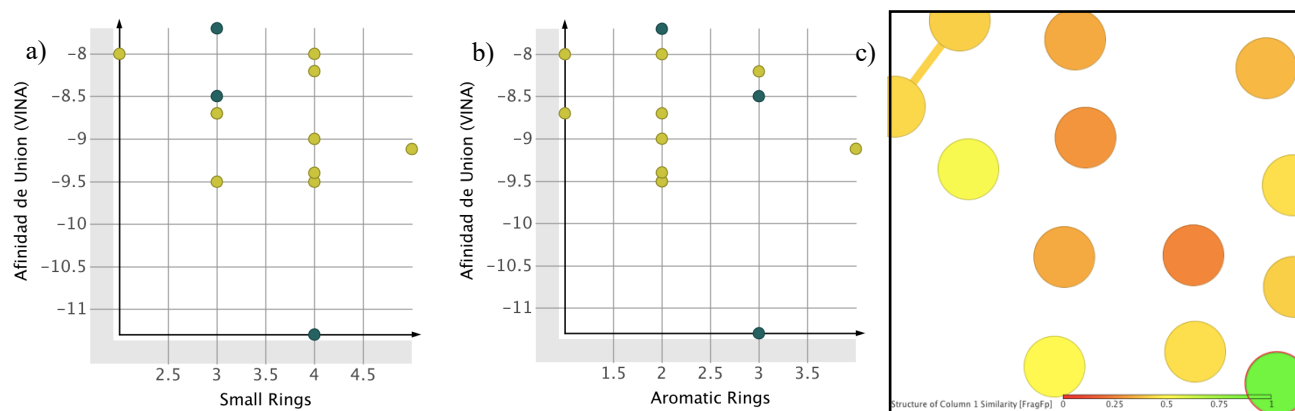


Figura 19. Los compuestos identificados contienen anillos aromáticos y valor *FragFP* menor a 0.53 al compararlos con *XCT790*. Por acoplamiento molecular en el programa *VINA*, se obtuvieron compuestos con energía de unión similar a los compuestos control (representados en verde oscuro) y los cuales **a)** presentan mayoritariamente 3 o 4 anillos carbonados, de los cuales **b)** 2 o 3 son aromáticos. **c)** Gráfico de similitud *FragFp*, en verde se presenta el compuesto firma (*XCT790*); la similitud de los compuestos comparados respecto a la firma, se representa en una escala de color, en la que los puntos de verdes y amarillos, muestran similitud de alta a intermedia, mientras que los de color naranja a rojo, representan poca similitud al compuesto firma. Análisis y gráficas generadas a partir del programa *DataWarrior* (*Open molecules*).

LBP principalmente mediante interacciones hidrofóbicas (Figura 20) con los residuos F382, L398, V491, L405, L401, V366 y F495 con anillos aromáticos (cloroquina, gliquidona, imanitib y nefazodona), triazolinas (imanitib y dasanitib), ciclohexilamina (gliburida) y benzopiranos (nebevólol), como lo hace con el indol y ciclohexilo del compuesto 1a, que se encuentran profundamente unidos dentro del LBP hidrófobo, interaccionando con L324 y F382 [72]. Respecto al compuesto 29, también se reportan interacciones hidrofóbicas con su sustituyente 2-trifluorometilo con los residuos L398, V491, L405, L401, V366, M362, F495 y M506 e interacciones de Van der Waals, principalmente con F328 para generar interacciones π [85].

En el fármaco identificado fenspirida, se aprecian puentes salinos con E331, similar al compuesto 1a, en cuya estructura se reporta que, los cambios conformacionales permiten la reorientación de la cadena lateral de E331, formando un puente salino y un puente de hidrógeno mediado por agua con el nitrógeno amino del compuesto 1a [72]. Esta reorientación es posible gracias al movimiento de la cadena lateral de F328, que crea espacio para E331 y el ligando [72]. Además, este glutámico es capaz de formar interacciones por carga, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y puentes salinos con los compuestos identificados. El E331 se encuentra conservado tanto en ER α como en ERR α , sugiriendo que su función está conservada para unir el ligando en estos receptores [88]. Otros tipos de interacciones contribuyen a la energía de unión de los compuestos seleccionados, tal es el caso de imatinib, el cual presenta 3 nitrógenos protonados que participan

en la formación de puentes de hidrógeno con los residuos R394, A396 y G397. Similar al compuesto 29, se observan interacciones tipo π -sulfuro se observaron para dasatinib y gliburida mediante F495, en las cuales los fármacos proporcionan el azufre. En el caso del compuesto 29 el residuo C325 proporciona el azufre [85].

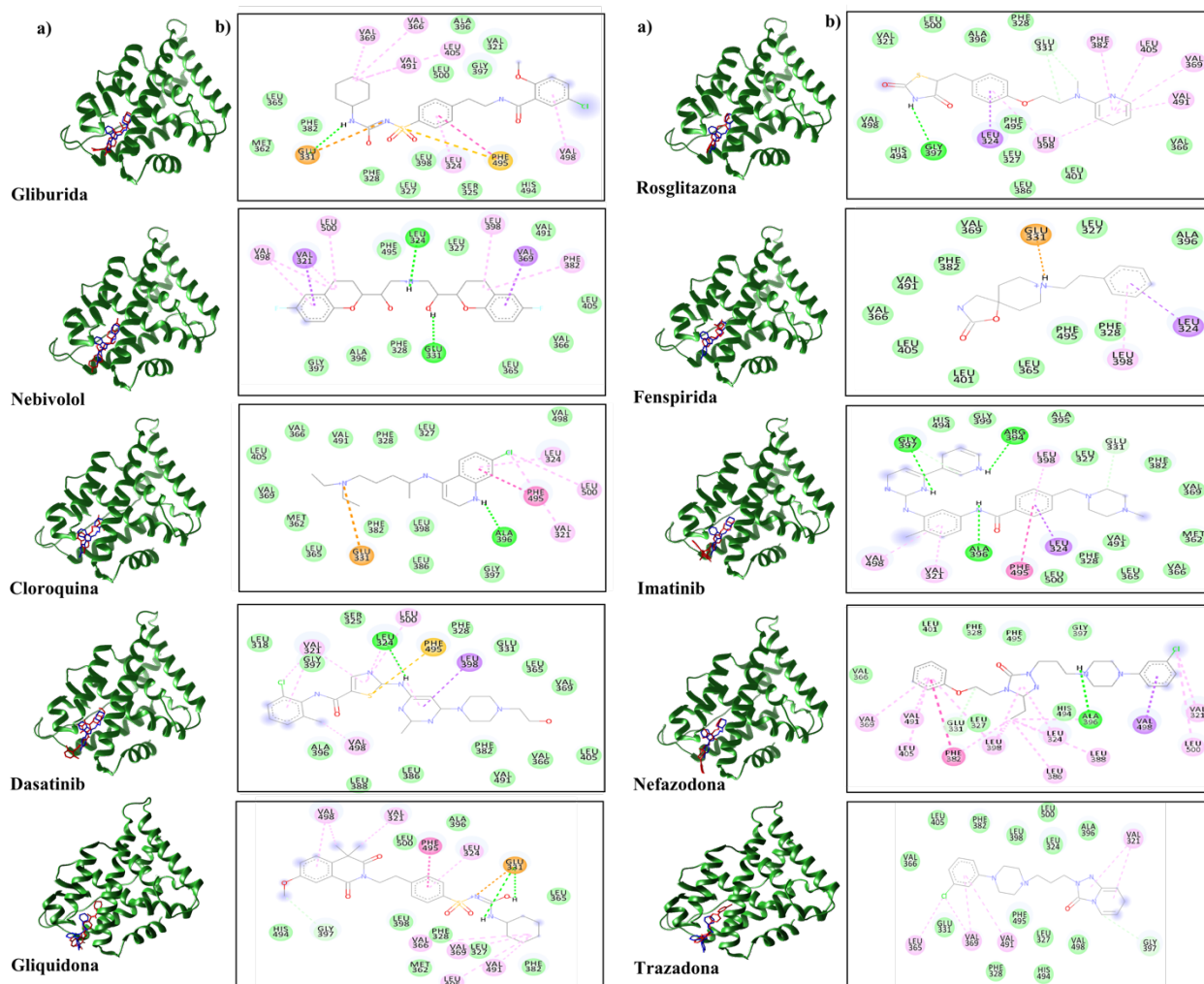


Figura 20. Sitio de unión e interacciones en el LBD de ER α de los compuestos seleccionados. a) El análisis estructural que muestra los 10 compuestos seleccionados (en rojo), que se unen en el sitio de unión a ligando del LBD de ER α (en verde), en posición similar al ligando ya reportado, compuesto 1a, (en azul), del modelo cristalográfico PDB ID: 2PJL. b) Representación 2D de las interacciones de los compuestos seleccionados con el sitio de unión mediante puentes de hidrógeno (línea punteada verde), puentes salinos (línea punteada naranja) e interacciones hidrofóbicas (línea punteada rosa y morada). Las imágenes fueron generadas a partir de los resultados del docking ciego de VINA en a) UCSF Chimera, b) Discovery Studio Visualizer.

El perfil farmacocinético del compuesto 29 ha sido evaluado en ratones en una dosis de 10 mg/kg por vía oral, mostrando una AUC₀₋₂₄ de 84.4 (área bajo la curva, cantidad de fármaco que llega a la circulación sistémica) y una biodisponibilidad absoluta de 77%, por lo que su perfil farmacocinético es considerandocomo favorable [85]. Además este compuesto ha sido propuesto

como agente potencial para el tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes tipo 2 [85], sin embargo no ha sido evaluado en humanos. Además, no hay reportes que evalúen al compuesto 29 como antineoplásico. Por su parte, XCT79 evita la interacción $ERR\alpha$ / PGC-1 α y es inactivo contra el resto de los ERRs y contra $ER\alpha$ [89], sin embargo, se ha reportado también como un desacoplante mitocondrial [77], sugiriendo que no es un fármaco ideal para uso en humanos por su potencial toxicidad. Respecto al compuesto 1a, no se han reportado sus propiedades farmacocinéticas o toxicidad, por lo que su desarrollo como fármaco, requeriría mayores estudios. Entonces, ninguno de los 3 compuestos que inhiben a $ERR\alpha$ puede implementarse rápidamente como fármaco para uso en humanos. Por el contrario, mediante este análisis *in silico*, se identificaron fármacos que se encuentran disponibles en el mercado y que son potenciales inhibidores de $ERR\alpha$ para uso clínico inmediato. No hay reportes que muestren que estos fármacos inhiban a $ERR\alpha$. Algunos se usan para el tratamiento de diabetes tipo 2, como rosglitazona, gliburida y gliquidona. Cabe mencionar que $ERR\alpha$, también ha sido propuesto como blanco molecular para el tratamiento de este padecimiento. Amplios estudios bioquímicos y farmacológicos destacan las complejas funciones reguladoras de $ERR\alpha$ en el mantenimiento de la homeostasis energética [72,90].

En la Figura 21 se muestra un resumen esquemático del procedimiento del análisis *in silico* por el cual se seleccionaron 10 compuestos con posible afinidad a $ERR\alpha$ y en la tabla 5 se muestra el Grid Score y Afinidad de unión de cada uno de los compuestos seleccionados, así como de los compuestos controles.

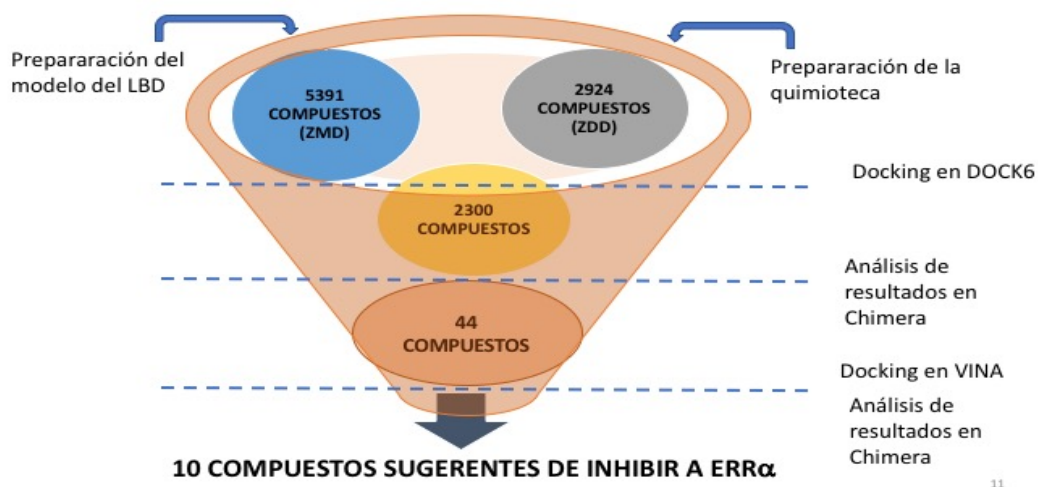
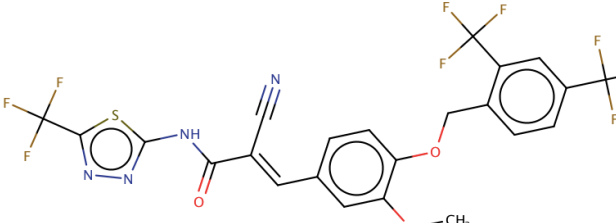
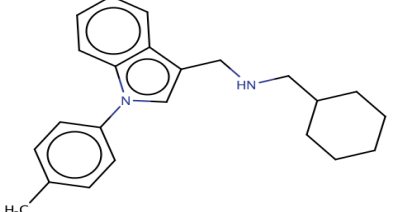
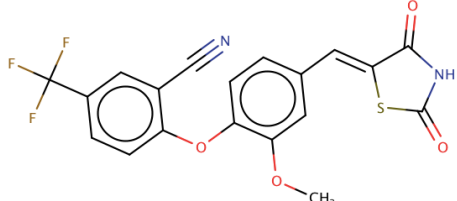
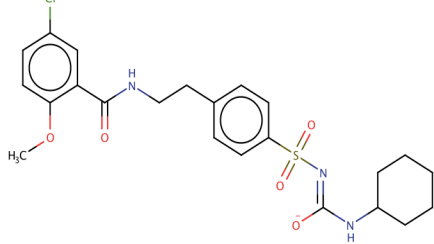
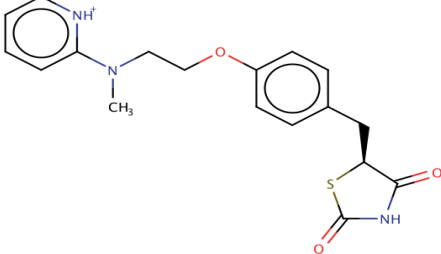
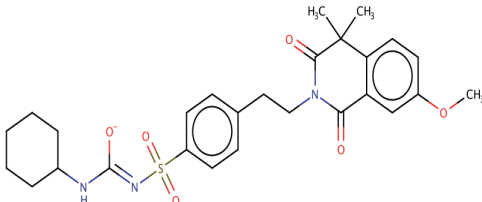


Figura 21. Diagrama de trabajo del análisis *in silico*.

Nombre	Estructura	Grid Score	Afinidad de unión
XCT790		-51.6808	-8.5
Compuesto 1a		-28.2308	-11.3
Compuesto 29		-35.2313	-7.7
Gliburida		-47.294712	-9.5
Rosiglitazona		-46.063164	-8.7
Gliquidona		-44.419514	-9.5

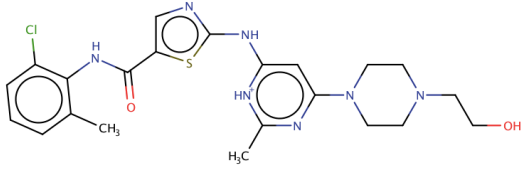
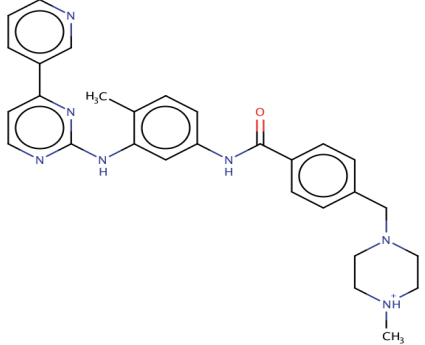
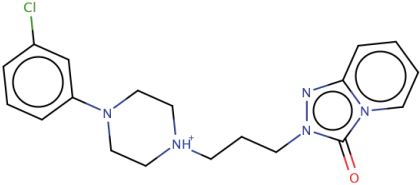
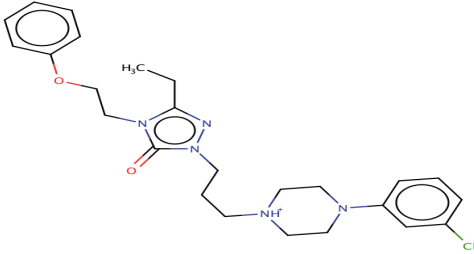
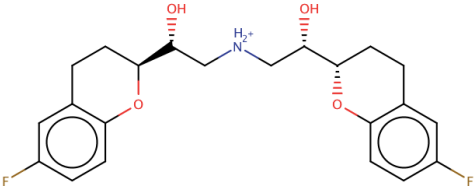
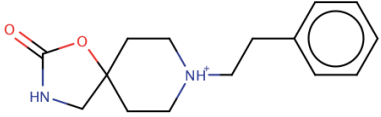
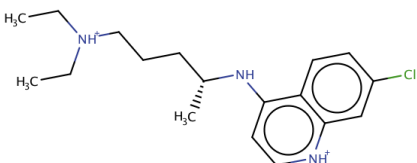
Dasatinib		-54.812489	-8.2
Imatinib		-56.918377	-9.12
Trazadona		-45.044441	-8
Nefazodona		-61.279247	-9
Nebivolol		-51.339111	-9.4
Fenspirida		-51.480537	-8.7
Cloroquina		-51.580578	-8

Tabla 5. Compuestos identificados de la predicción in silico y compuestos usados en el tamiz como controles (mostrados en letras azules)

Análisis in vitro

Para evaluar el efecto de los fármacos identificados *in silico*, sobre la inhibición de la actividad transcripcional de $ERR\alpha$, se utilizó un sistema de gen reportero de luciferasa, en el que se evaluaron tres combinaciones de plásmidos transfectados en líneas celulares de cáncer de mama (Figura 22).

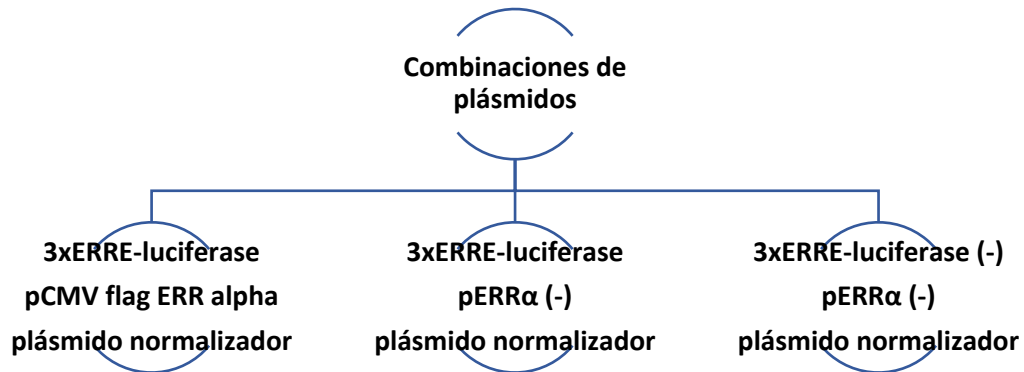


Figura 22. Combinaciones de plásmidos transfectados en líneas celulares de cáncer de mama, para evaluar el efecto de los fármacos identificados sobre la actividad transcripcional de $ERR\alpha$. El plásmido pCMV flag ERR alpha contiene la secuencia codificante para $ERR\alpha$, mientras que el plásmido 3xERRE-luciferase contiene la secuencia de unión a ADN de $ERR\alpha$. Los plásmidos marcados con (-), carecen de la respectiva secuencia. A cada sistema se incluye un plásmido normalizador.

Estándarización del ensayo de luciferasa

El “Dual-Luciferase® Reporter Assay”, permite evaluar la expresión y actividad de dos enzimas luciferasa transfectadas de forma simultánea dentro de un solo sistema. Una luciferasa proviene del insecto luciérnaga (*Photinus pyralis*), la cual es el reportero “problema”, mientras que la otra luciferasa proviene del pólipo de mar *Renilla reniformis*, y es el reportero “normalizador”. Estas enzimas funcionan como reporteros de la transcripción, puesto que no se expresan de forma endógena en las células de mamífero y presentan afinidad a diferentes sustratos, por lo que la actividad de cada una puede medirse de forma específica en una única muestra mediante la detección de luz en un luminómetro. El reportero "problema" o “experimental”, luciferasa de luciérnaga, se expresó bajo el control transcripcional de $ERR\alpha$ mediante el plásmido p3XERRE y responde a las condiciones experimentales, que en nuestro caso permite evaluar el efecto de los compuestos candidatos que pudieran inhibir a $ERR\alpha$. Mientras que la actividad del reportero "normalizador", luciferasa de *Renilla reniformis*, proporciona un control interno que permite normalizar la variabilidad experimental causada por las diferencias en la viabilidad celular, eficiencia de transfección o eficiencia en la lisis. Por lo tanto, Dual-Luciferase® Reporter Assay,

permite una interpretación más confiable de los datos experimentales al reducir la variabilidad del ensayo mediante la normalización con el control interno de *Renilla*.

El plásmido reportero “experimental o problema” se llama 3XERRE-luciferase y contiene 3 secuencias repetidas del elemento de respuesta de ERR α , seguido del promotor SV40 y la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga, lo que le permite expresar luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional de ERR α . Mientras que se probaron dos plásmidos normalizadores: inicialmente se probó pRL-SV40 que cuenta con el promotor SV40 y la secuencia codificante de luciferasa de *Renilla*. Para determinar la relación ideal entre los plásmidos para transfectar, se realizó una transfección con lipofectamina 3000 en la línea celular MCF7 con el “sistema completo” de plásmidos, que incluye los plásmidos 3xERRE-luciferase (125 ng/pozo), pCMV flag ERR alpha (125 ng/pozo) y variando la cantidad del plásmido “normalizador” de *Renilla* pRL-SV40 (3.125, 6.25, 12.5 y 25 ng/pozo), (Figura 23 a-c). Los resultados muestran que existe una relación inversa en la cantidad de plásmido pRL-SV40 transfectado y la señal de luciferasa de luciérnaga, sugiriendo que la expresión de la enzima se ve afectada, posiblemente por una competencia de los promotores de los plásmidos reporteros por la maquinaria transcripcional celular, debido a que ambos plásmidos contienen el mismo promotor [91]. Además, 24 horas posterior a la transfección, las células con 25 ng de pRL-SV40 /pozo se observaban poco adherentes y con morfología anómala, sugiriendo que la baja señal que se observa en ambas enzimas se debe a la muerte celular por la transfección con exceso de plásmido.

Por lo tanto, se optó por analizar cantidades menores de plásmido pRL-SV40 (0.25, 0.5, 1.25 y 2.5 ng/pozo), (Figura 23 a'-c'). En este experimento se observó que no hay diferencia significativa en la señal de luciferasa de luciérnaga de los grupos con diferentes cantidades transfectadas del plásmido pRL-SV40, sugiriendo que en cantidades de 0.25 a 2.5 ng/pozo de plásmido, la transcripción del reportero problema no se ve afectada; sin embargo los valores de la señal de luciferasa de *Renilla* fueron muy similares a los valores de luciferasa de luciérnaga, inclusive en los grupos en los que se transfectó una baja cantidad de plásmido normalizador de 0.25 y 0.5 ng/pozo (Figura 23 a'-c'). Estos resultados pueden explicarse debido a que el ensayo mide de forma indirecta la transcripción del gen reportero. Ya que lo que se mide es el producto de la reacción enzimática catalizada, es de esperarse que otros factores como la actividad enzimática puedan influir en el ensayo. Se ha reportado que luciferasa de *Renilla* es un catalizador más

eficiente que la luciferasa de luciérnaga [92], por lo que se optó por probar un plásmido con un promotor más débil, diferente a SV40, en bajas proporciones respecto al plásmido problema.

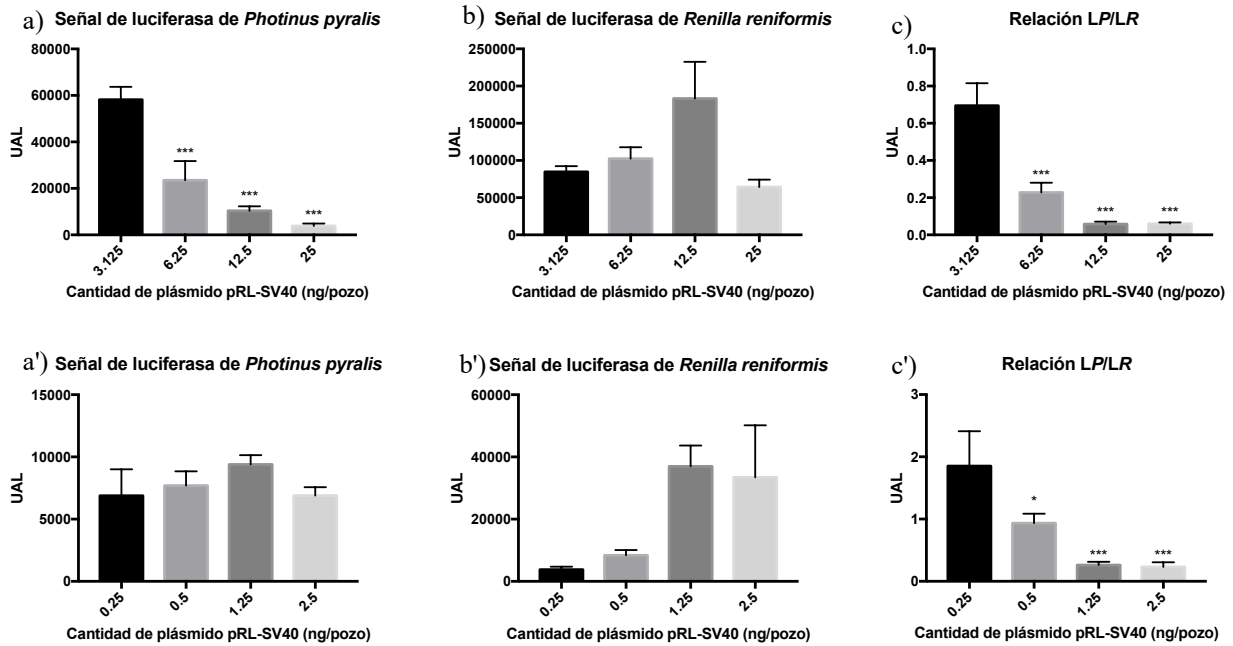


Figura 23. La cantidad transfectada de pRL-SV40 afecta la expresión de luciferasa de *Photinus*. Células MCF7 fueron transfectadas con el sistema completo de plásmidos, utilizando como plásmido normalizador pRL-SV40 en diferentes cantidades. (a) Señal detectada de *Photinus pyralis*, (b) *Renilla reniformis*, (c) Relación señal de luciferasa de *Photinus pyralis*/*Renilla reniformis*. (UAL: Unidades Arbitrarias de Luz) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

El plásmido que se evaluó pRL-TK que contiene el promotor débil del gen timidina quinasa del virus de herpes simple, y que se transfectó en las cantidades 2.5, 5, 12.5 y 25 ng/pozo. Las cantidades evaluadas de pRL-TK no afectaron la señal de luciferasa de luciérnaga y las señales detectadas a 5 y 2.5 ng/pozo fueron hasta 5 veces menores que la señal de luciferasa de luciérnaga, pero mayor a la señal de fondo (Figura 24). Por lo que se decidió utilizar este plásmido como normalizador en la cantidad de 5 ng/pozo.

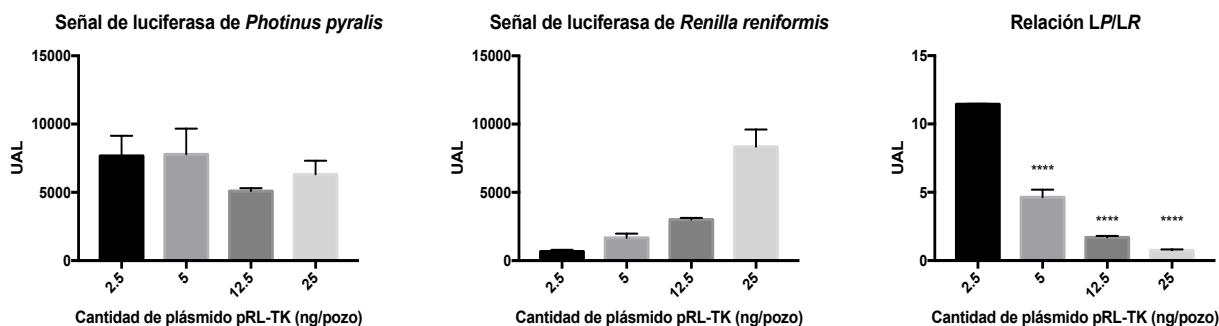


Figura 24. 2.5 a 25 ng/pozo del plásmido pRL-TK no afecta la expresión de luciferasa de *Photinus pyralis*. Células MDA-MB-231 fueron transfectadas con el sistema completo de plásmidos, utilizando como plásmido normalidor pRL-TK en diferentes cantidades. a) Señal detectada de *Photinus pyralis*, b) *Renilla reniformis*, c) Relación señal de luciferasa de *Photinus pyralis*/*Renilla reniformis*. (UAL: Unidades Arbitrarias de Luz) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$)

Para evaluar el funcionamiento de nuestros sistemas de plásmidos, se transfectaron las líneas celulares SK-BR-3 y MDA-MB-231 con los tres sistemas de plásmidos, el sistema al cual se llamó “sistema completo” (Figura 25) cuenta con un plásmido que expresa la proteína ERR α (pCMV flag ERR alpha) cuya expresión está regulada por el promotor eucarionte de citomegalovirus (CMV), además cuenta con el plásmido reportero problema que expresa la luciferasa de luciérnaga, que como se mencionó anteriormente, este plásmido cuenta con el promotor SV40 y río arriba de éste, tiene una secuencia que reconoce ERR α (elemento de respuesta de ERR α , abreviado ERRE). Cabe mencionar que este plásmido se expresa independientemente de la actividad de ERR α pues cuenta con un promotor fuerte de expresión en eucariontes, sin embargo, con la inserción de ERRE en el plásmido reportero y con la sobreexpresión de ERR α , se espera que la expresión de la proteína reportera aumente y a su vez se observe un aumento en la señal detectada por el luminómetro.

Por otro lado, se cuenta con el “sistema intermedio”, en el que se incluye, al igual que en el sistema completo, el plásmido con los elementos de respuesta de ERR α (p3XERRE), sin embargo no se cuenta con la expresión exógena (vía plasmídica) de ERR α , pues el plásmido que se incluye es un plásmido vacío, es decir el plásmido pERR α (-), por lo que en este sistema se evaluó la actividad endógena de ERR α .

Por último, está el “sistema vacío”, el cual cuenta con el plásmido pGL3 promotor, que al igual que p3XERRE, expresa luciferasa de luciérnaga y cuenta con el promotor SV40, pero no contiene los ERRE. Este sistema también cuenta con el plásmido pERR α (-), por lo que este sistema sirve como control ya que la expresión de luciferasa de luciérnaga es independiente de la actividad de ERR α y es regida únicamente por el promotor SV40, por lo que se debe observar una señal menor

al sistema completo e intermedio. Con lo anteriormente mencionado, se espera un inhibidor de $ERR\alpha$ disminuirá la expresión del gen reportero en el sistema completo e intermedio, observando una disminución en la señal emitida por luciferasa, mientras que en el sistema vacío no se observará este efecto, pues la expresión no está regulada por $ERR\alpha$.

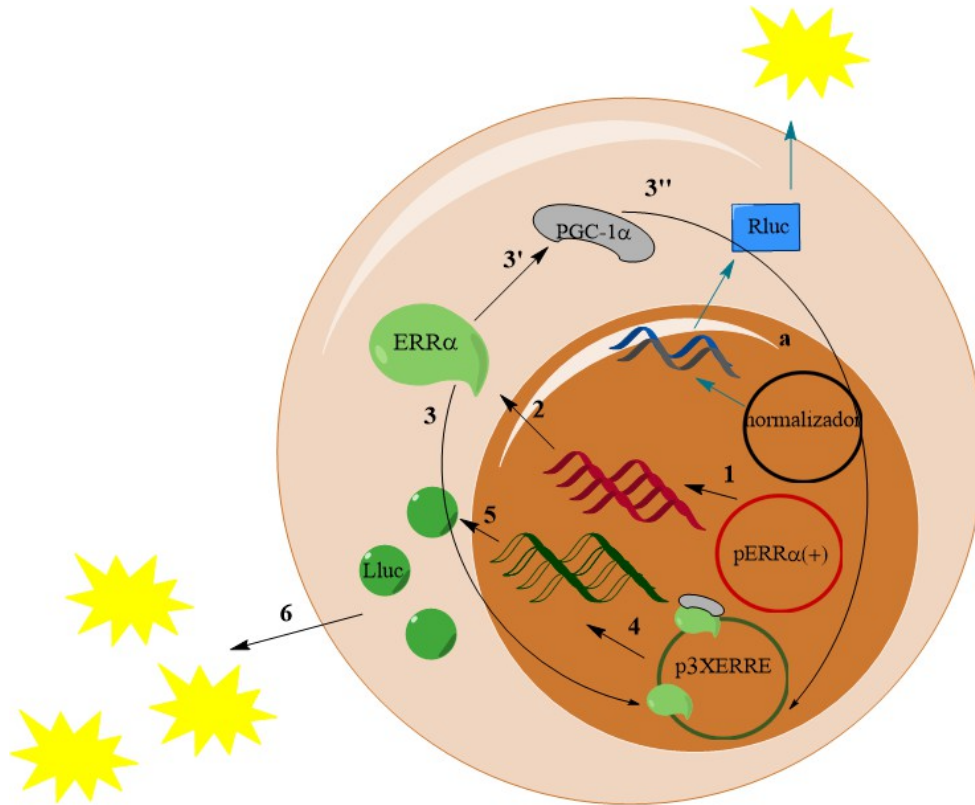


Figura 25. Representación esquemática del sistema completo de plásmidos del ensayo de luciferasa. El proceso esperado de este sistema de plásmidos es que 1) el plásmido pERRα (+) se transcriba por efecto del promotor eucarionte CMV y a su vez se 2) traduzca en ERRα. La sobreexpresión de la proteína permitirá que pueda 3) traslocarse al núcleo o 3') interactuar con PGC-1α para posteriormente 3'') traslocarse al núcleo y así reconocer los ERRE en el plásmido p3XERRE, generando un aumento en la transcripción de la luciferasa de luciérnaga (LLuc) y de esta forma aumentar la señal de luz. Un proceso similar es esperado en el sistema intermedio, a excepción del paso 1, ya que ERRα no se sobreexpresa, debido a que el plásmido no cuenta con la secuencia codificante, por lo que el proceso de transcripción es únicamente endógeno. Mientras que el sistema vacío no contará con ERRα plasmídico y, la expresión de LLuc es regulada únicamente por el promotor SV40 y no por la actividad de ERRα. También se cuenta con el plásmido normalizador cuyo proceso es de transcripción y traducción de luciferasa de Renilla (RLuc), el cual es independiente de ERRα y se representa en flechas azules.

Además, como mencionamos inicialmente, también se transfecta un plásmido normalizador en cada sistema, por lo que durante la detección de la señal en el luminómetro se obtienen dos lecturas, una correspondiente a la actividad de luciferasa de luciérnaga (LP), es decir nuestro plásmido problema, y otra correspondiente a la luciferasa del plásmido normalizador (LR). Por lo tanto, el parámetro que más información da sobre la actividad transcripcional es la relación LP/LR, es decir la actividad proveniente de la luciferasa de luciérnaga normalizada con la de *Renilla*.

La relación LP/LR en las líneas celulares MDA-MB-231 y SK-BR-3 muestra que la señal es mayor en el sistema completo, atribuyendo dicho efecto al aumento en la expresión de ERR α por el plásmido pCMV Flag ERR α . Debido a que en el grupo sistema intermedio I, en el que se evaluó la actividad de ERR α endógeno mediante el plásmido que contiene los elementos de respuesta de ERR α y el promotor SV40 (3xERRE-luciferase), la señal detectada es similar al sistema vacío, en el cual la expresión del gen reportero únicamente está regulada por el promotor SV40.

Se ha mostrado que la actividad transcripcional de ERR α aumenta al fosforilarse, mediante vías reguladas por receptores tirosina cinasas como Her2 a través de la señalización de MEK/MAPK y PI3K/Akt. Los resultados obtenidos, muestran que la relación LP/LR en el sistema completo es mayor en la línea celular SK-BR-3 al compararla con la línea celular MDA-MB-231 (Figura 26). Estos resultados convergen con lo reportado por Chang *et. al*, quienes mediante un análisis por microarreglos mostraron que la línea celular SK-BR-3 presenta alta actividad transcripcional de ERR α , y a su vez, este fenómeno puede explicarse debido a que la línea celular SK-BR-3 presenta una alta expresión de Her2. Por lo tanto, se sugiere que esta diferencia entre líneas celulares es debido a que en la línea SK-BR-3, ERR α puede estar mayormente activa a través de fosforilaciones mediadas en las vías reguladas por Her2 [93].

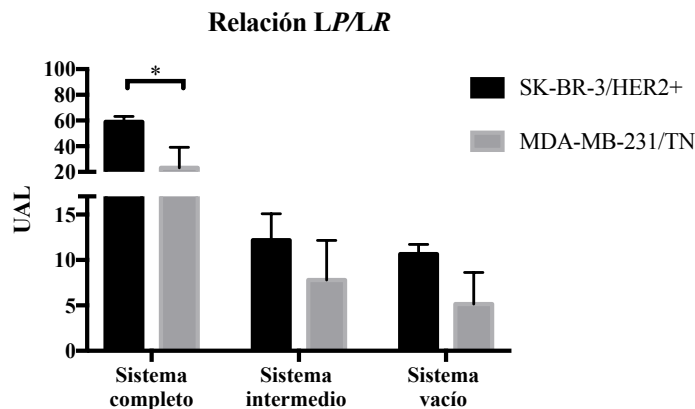


Figura 26. ERR α tiene mayor actividad transcripcional en la línea celular SK-BR-3. Células MDA-MB-231 y SK-BR-3 fueron transfectadas con los sistemas de plásmidos, en el que ambas líneas muestran una mayor señal de luciferasa en el sistema completo, pero este efecto es mayormente observado en la línea celular SK-BR-3 sugiriendo que ERR α tiene mayor actividad en esta línea celular. * $p < 0.05$

Una vez probados los sistemas se realizó el mismo protocolo, pero bajo el tratamiento con el inhibidor de ERR α XCT790 15 μ M en las líneas celulares MDA-MB-231 y SK-BR-3. Se observó

que a concentraciones de 15 μM XCT790 ejerce un efecto inhibitorio de la actividad transcripcional de $\text{ERR}\alpha$ en 24 horas en ambas líneas celulares (Figura 27).

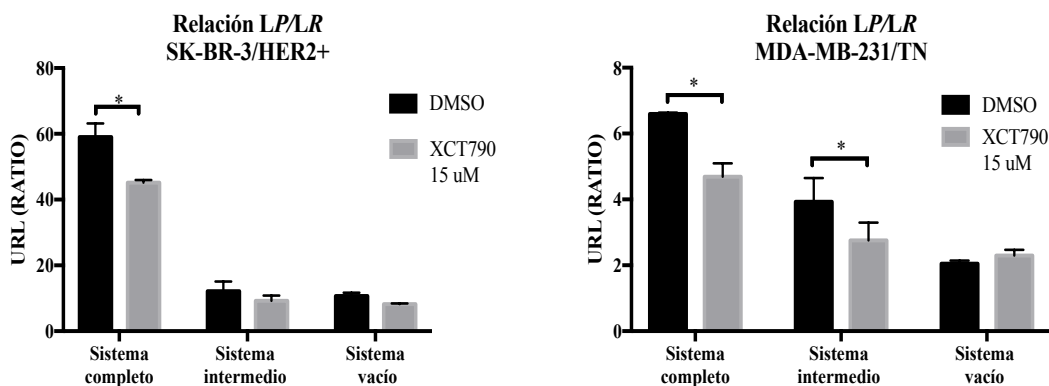


Figura 27. XCT790 (15 μM) inhibe la actividad transcripcional de $\text{ERR}\alpha$ en el ensayo de reportero transcripcional de luciferasa en las líneas celulares SK-BR-3 Y MDA-MB-231. (* $p < 0.05$)

Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz *in silico* sobre la actividad transcripcional de $\text{ERR}\alpha$ mediante el ensayo de luciferasa.

Los fármacos de la predicción *in silico*, se agruparon en función a su uso terapéutico (Tabla 6) y se seleccionaron cinco para su evaluación *in vitro*. Las concentraciones probadas fueron elegidas en función a una revisión bibliográfica, eligiendo concentraciones a las que se reportan efectos en el cultivo celular con los fármacos seleccionados (Tabla 6).

Uso terapéutico	Fármaco	Concentración utilizada	Referencias
Tratamiento de diabetes tipo 2.	Gliburida	30 μM	[94,95]
	Gliquidona	30 μM	[96,97]
	Rosiglitazona	30 μM	[98,99]
Tratamiento de leucemia mieloide.	Dasatinib	50 nM	[100,101]
	Imatinib	15 μM	[102,103]

Tabla 6. Uso terapéutico y concentraciones reportadas con algún efecto en cultivo celular de los cinco fármacos de la predicción *in silico*.

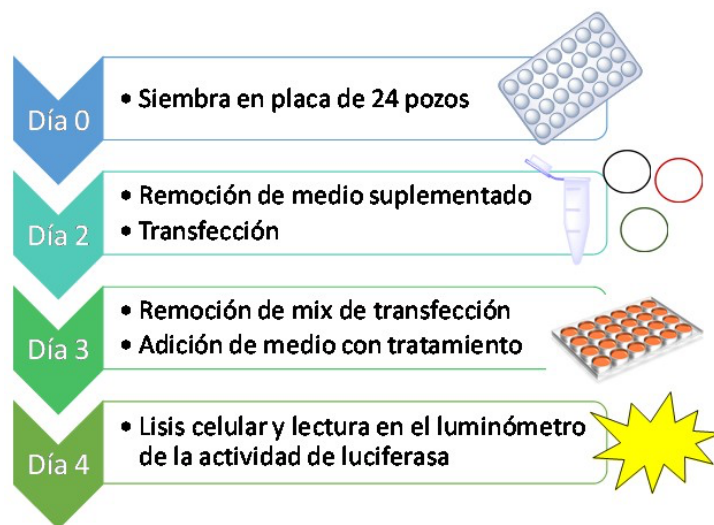


Figura 28. Esquema de trabajo del ensayo de luciferasa para evaluar la actividad de $ERR\alpha$ bajo el tratamiento de los fármacos seleccionados de la predicción *in silico*.

Debido a que no se apreció una inhibición significativa por XCT790 en la línea celular MCF7, no se consideró como un buen modelo para evaluar los fármacos de la predicción *in silico*, por lo que las líneas utilizadas para los posteriores experimentos fueron SK-BR-3 y MDA-MB-231. La evaluación mediante el ensayo de luciferasa de los fármacos seleccionados (Figura 28) muestra que la mayoría de los fármacos evaluados, como gliburida y gliquidona disminuyen la actividad de luciferasa en el “Sistema completo” de forma significativa al ser comparados contra el vehículo DMSO (Figura 29), sugiriendo que este efecto podría ser debido a una inhibición de $ERR\alpha$. Por el contrario, el “Sistema vacío” no muestra un cambio en la señal emitida por luciferasa, sugiriendo que la disminución de la señal en el “sistema completo” tratado, es por la inhibición de $ERR\alpha$ y no por algún efecto sobre la maquinaria transcripcional, ya que la expresión de luciferasa en el sistema vacío se encuentra regulada por el promotor eucarionte SV40, a diferencia del sistema completo que además de este promotor cuenta con los elementos de respuesta de $ERR\alpha$.

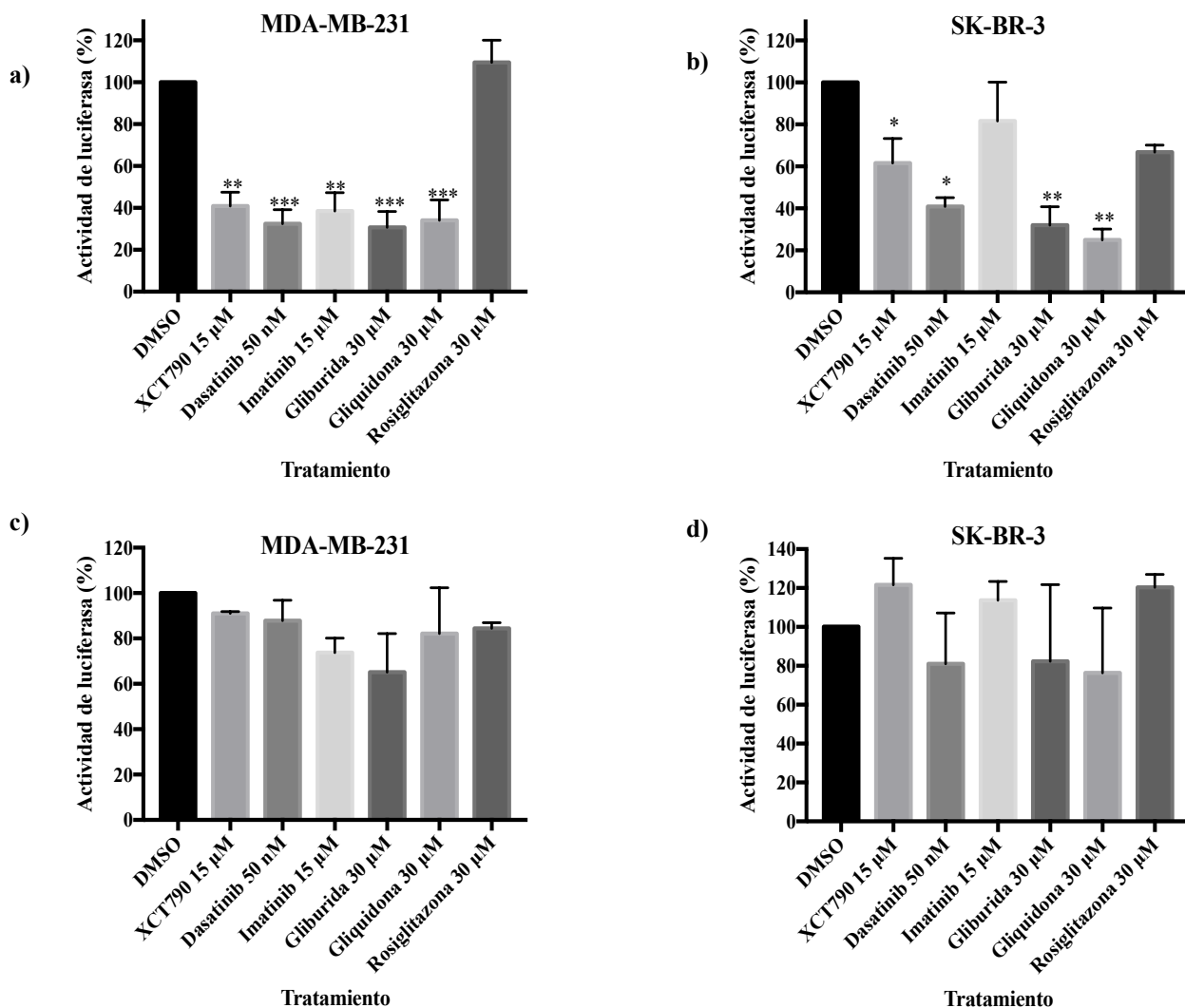


Figura 29. El tratamiento con los fármacos sugeridos por el tamiz in silico, disminuye la actividad transcripcional de *ERRα*. Efecto de los fármacos seleccionados sobre la actividad de luciferasa en la línea celular a) MDA-MB-231 y b) SK-BR-3 en el “sistema completo” de plásmidos. Efecto de los fármacos seleccionados sobre la actividad de luciferasa en la línea celular c) MDA-MB231 y d) SK-BR-3 en el “sistema vacío” de plásmidos. La actividad de luciferasa con el tratamiento de los fármacos seleccionados fue comparada con DMSO considerando este grupo como el 100% de actividad (* $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$). Las células tratadas se incubaron por 24 h a las concentraciones que se indica en la figura.

En la línea celular SK-BR-3, los fármacos en los que se observó disminución en la señal de luciferasa fue con dasatinib, gliburida y gliquidona, mientras que con rosiglitazona e imatinib no se observó una disminución significativa. Resultados similares fueron obtenidos en la línea celular MDA-MB-231, a excepción de que con imatinib sí mostró disminución en la señal de luciferasa en el sistema completo.

Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz in silico, sobre ensayos de clonogenicidad y de proliferación celular.

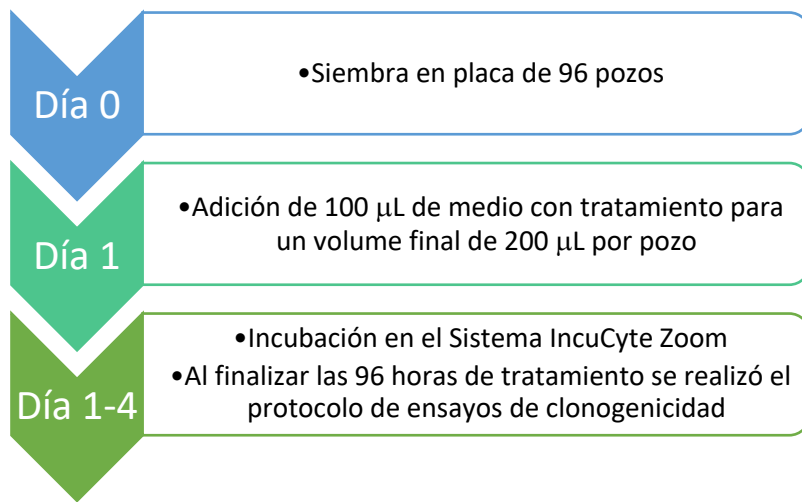


Figura 30. Esquema de trabajo para evaluar la proliferación de las líneas celulares bajo el tratamiento de los fármacos seleccionados de la predicción in silico.

La tinción con cristal violeta tras 96 horas de tratamiento, mostró disminución en la absorbancia de las células con tratamiento al compararlas contra el grupo vehículo (Figura 31 c,d), sugiriendo una disminución en el número de células por pozo. Estos resultados concuerdan con las curvas de proliferación de las dos líneas celulares, obtenidas mediante el sistema IncuCyte ZOOM (Figura 31 a,b). Sin embargo, interesantemente no se encuentra disminución en el porcentaje de confluencia a las 24 horas de tratamiento, que es el tiempo que las células se trataron para el ensayo de luciferasa. Esto sugiere que la inhibición de la actividad transcripcional de $ERR\alpha$ ocurre a tiempos más cortos de tratamiento que la inhibición de la proliferación, compatible con que la disminución de la proliferación ocurra vía $ERR\alpha$.

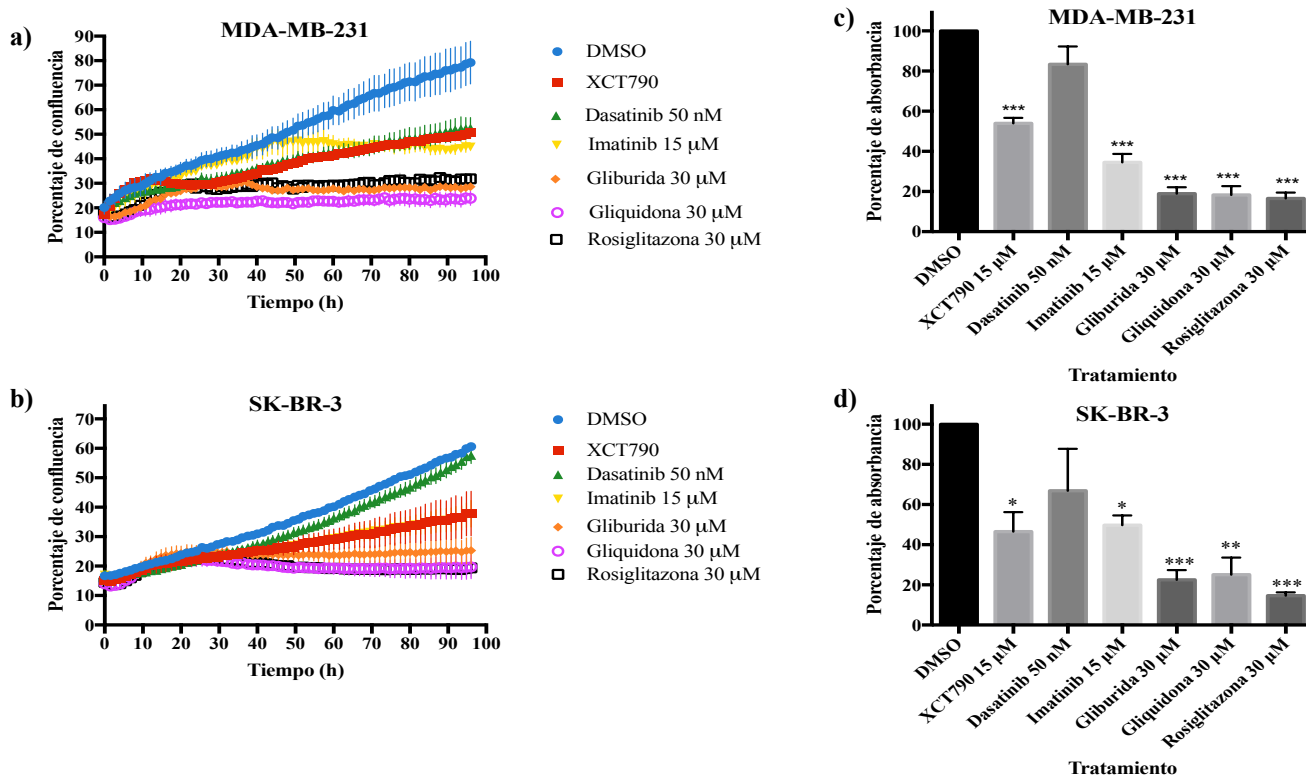


Figura 31. El tratamiento con los fármacos evaluados disminuye la proliferación de dos líneas celulares de cáncer de mama. Curvas de proliferación de 96 horas de la línea a) MDA-MB231 y b) SK-BR-3 bajo el efecto de los fármacos identificados, a las concentraciones que se indican (mismas concentraciones usadas en el ensayo de luciferasa). Ensayos de clonogenicidad de las líneas celulares c) MDA-MB-231 y d) SK-BR-3 tras 96 horas de tratamiento con los fármacos seleccionados. La absorbancia identificada en el grupo DMSO fue considerada como el control sin inhibición (100 %) y los fármacos seleccionados fueron comparados con este grupo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

Efecto de los fármacos obtenidos del tamiz *in silico*, sobre la localización celular de ERR α .

Como se mencionó anteriormente, ERR α regula genes implicados en el metabolismo celular y es mayormente expresado en órganos con alta demanda metabólica. La actividad y expresión de ERR α es influenciada por su coactivador PGC-1 α cuya expresión es constitutiva, sin embargo aumenta en condiciones de estrés metabólico, que a su vez permite que ERR α se encuentre mayormente activo [83,104]. Con estos antecedentes, se diseñó un experimento con la línea celular SK-BR-3 en condiciones de privación de nutrientes (Figura 32), con la finalidad de inducir un aumento en la actividad y expresión de ERR α y PGC-1 α . Este experimento se realizó con el medio de cultivo bajo en nutrientes: medio simple optimizado de potasio (KSOM), que a diferencia del medio McCoy 5A (medio de cultivo con el que se realizaron los experimentos anteriores) contiene menores cantidades de glutamina y glucosa (glutamina: KSOM 0.146 g/L,

McCoy 5A 0.219 g/L; glucosa: KSOM 1.101 g/L, McCoy 5A 3 g/L). Debido a que $ERR\alpha$ es un factor de transcripción, su localización nuclear sugiere que $ERR\alpha$ se encuentra activo. Por lo tanto, como experimento piloto, nosotros evaluamos su localización celular mediante ensayos de inmunofluorescencia bajo el tratamiento de los fármacos seleccionados de la predicción *in silico* y en condiciones de privación de nutrientes.

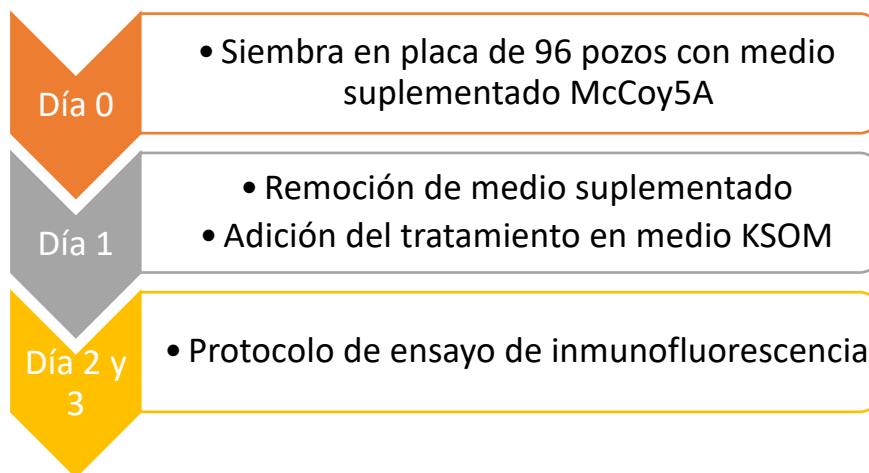
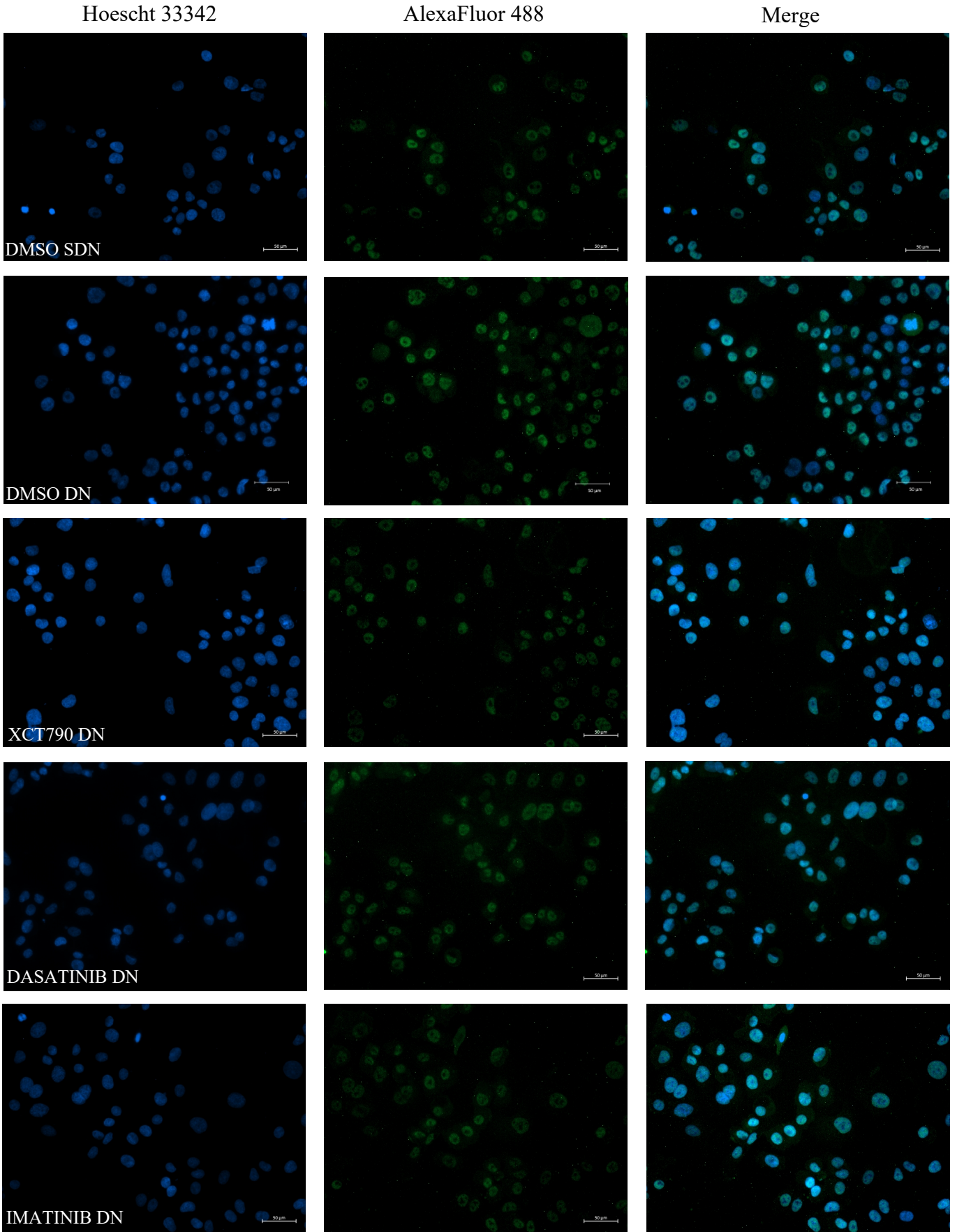


Figura 32. Esquema de trabajo para evaluar el efecto de los fármacos en la localización celular de $ERR\alpha$

Como control nosotros utilizamos el vehículo DMSO sin privación de nutrientes (SDN) y en privación de nutrientes (DN), observando en la primera condición una baja señal de $ERR\alpha$ en las células tanto en el citoplasma como en el núcleo, mientras que en privación de nutrientes se observa una mayor señal nuclear, sugiriendo que $ERR\alpha$ se activa por la privación de nutrientes. Este efecto es revertido al tratar a las células con XCT790, en el que se observa una baja localización nuclear y prácticamente ausente en el citoplasma (Figura 33). Por otro lado, los fármacos dasatinib, imatinib y rosiglitazona muestran un efecto similar a DMSO DN, es decir, aumento en la señal nuclear. Sin embargo, los fármacos gliburida y gliquidona produjeron una disminución en la señal de $ERR\alpha$.



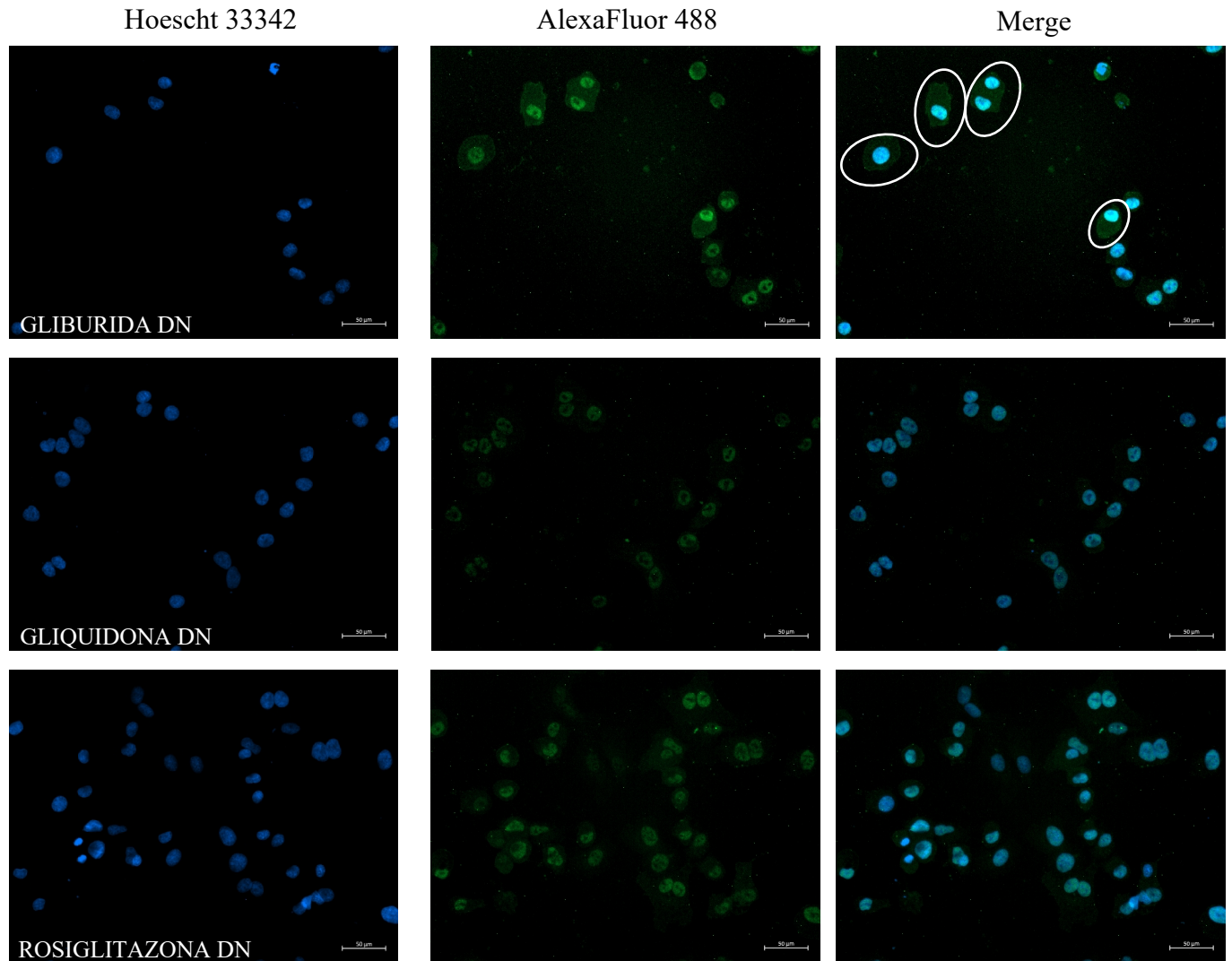


Figura 33. El tratamiento de gliburida disminuye la localización nuclear de $ERR\alpha$ en condiciones de privación de nutrientes en la línea celular *SK-BR-3*. Células *SK-BR-3* fueron privadas de nutrientes (DN) y tratadas con los fármacos de la predicción *in silico* y el compuesto control *XCT790*. Se incluyó un grupo sin privación de nutrientes con el vehículo *DMSO* (*DMSO SDN*) y un grupo con *DMSO* privación de nutrientes (*DMSO DN*).

En el caso de gliburida la señal detectada parece ser mayormente citoplásmica, que a diferencia del resto de fármacos, la célula se logran definir por completo (mostrado en óvalos) y no sólo el núcleo, sugiriendo que si hay expresión de $ERR\alpha$, pero que su traslocación al núcleo, y por ende su actividad, parecen estar inhibidas por gliburida. Mientras que con el fármaco gliquidona la localización nuclear disminuye al compararla con *DMSO DN* y la citoplásmica es prácticamente ausente, sugiriendo que gliquidona tiene un efecto en la expresión de $ERR\alpha$ (Figura 33).

Con todos los resultados de los experimentos anteriores se resume lo siguiente:

Fármaco	Grid Score	Afinidad de Unión	Porcentaje de actividad de luciferasa		Porcentaje de disminución en la proliferación a 96 horas de siembra		Efecto en la localización celular
			MDA-MB-231	SK-BR-3	MDA-MB-231	SK-BR-3	
XCT790	-51.6	-8.5	40.93	61.54	47.28	37.60	Disminución en la localización citoplásmica y nuclear
Dasatinib	-54.8	-8.2	32.43	40.88	45.26	4.94	Sin cambios
Imatinib	-56.9	-9.12	38.48	81.64	54.16	37.71	Sin cambios
Gliburida	-47.2	-9.5	30.62	32.05	70.31	58.24	Localización citoplasmática
Gliquidona			34.1	25.07	75.12	67.51	Disminución en la localización citoplasmática y nuclear
Rosiglitazona			109.44	66.83	66.84	68.65	Sin cambios

De los fármacos evaluados gliburida y gliquidona pertenecen al grupo de las sulfonilureas. Como se mencionó anteriormente, el uso de hipoglucemiantes como metformina, la cual es una biguanida, se ha relacionado con una disminución en la incidencia global de cáncer [19–22]. Sin embargo, aún se encuentra en estudio si el uso de sulfonilureas, que también son hipoglucemiantes, pudieran ejercer este efecto.

Las sulfonilureas gliburida y gliquidona tienen como mecanismo de acción conocido la unión a los receptores de sulfonilureas (SUR), cuya asociación con cuatro subunidades Kir6.x y cuatro

SUR forma un canal conductor de iones comúnmente conocido como el canal potasio dependiente de ATP (KATP) [105,106]. La unión de las sulfonilureas a SUR en las células beta pancreáticas, impide el reflujo del ion potasio ocasionando un cambio en el potencial de membrana y a su vez la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes [105,106]. De esta forma se incrementa la fusión de los gránulos transportadores de insulina con la membrana celular provocando finalmente, un aumento en la secreción de la insulina [107] (Figura 34).

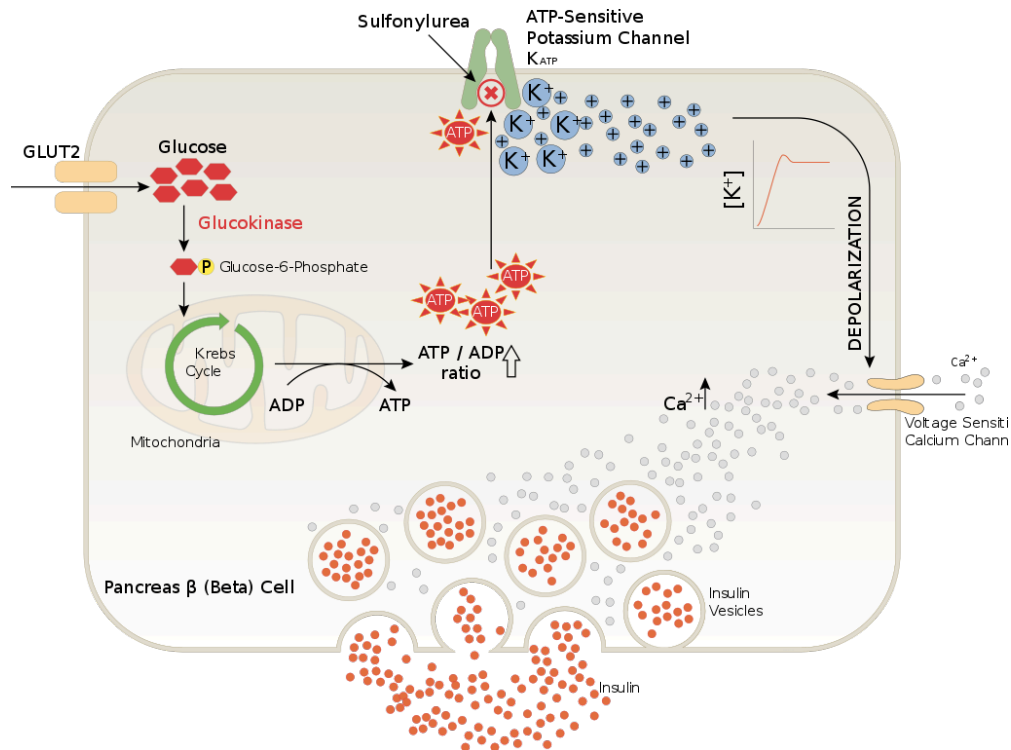


Figura 34. Mecanismo de acción de las sulfonilureas en el tratamiento de diabetes tipo 2.

Se ha propuesto que el incremento de insulina en sangre aumentaría el riesgo de cáncer mediante un posible efecto mitogénico a través de su unión al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, por lo que es de esperarse que fármacos secretagogos de insulina podrían aumentar el riesgo de cáncer al causar hiperinsulinemia. Sin embargo, se ha reportado que gliburida funciona como un agente antitumoral básicamente a través de dos categorías de mecanismos: 1) un inhibidor general de la superfamilia de proteínas ABC y 2) un inhibidor de los canales KATP [107].

La glicoproteína P (P-gp), producto del gen MDR1 y miembro de la superfamilia ABC, es de gran relevancia en el tratamiento del cáncer ya que su sobreexpresión se asocia con el desarrollo del fenotipo de resistencia a agentes quimioterapéuticos y se correlaciona con un mal pronóstico para pacientes con cáncer [108,109]. Golstein *et. al* demostraron que la gliburida y algunas

sulfonilcianoguanidinas relacionadas estructuralmente inhiben la glucoproteína P y al parecer son inhibidores generales de los transportadores ABC [110] (Figura 35a). Otro miembro de la superfamilia ABC, que también es inhibido por sulfonilureas, es un canal de calcio llamado proteína de regulación de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) [111]. La inhibición por gliburida induce la apoptosis en células HepG2 ya que gliburida genera un aumento rápido y sostenido de Ca^{2+} intracelular, mientras que el tratamiento con un agente quelante genera una inhibición significativa de la apoptosis inducida por gliburida [112] (Figura 35b). Esta información sugiere posibles mecanismos que podrían contribuir a la disminución de la proliferación celular bajo el tratamiento con gliburida y gliquidona. Sin embargo, no hay reportes que muestren que estas sulfonilureas se unan a $\text{ERR}\alpha$ como lo sugiere nuestro tamiz *in silico*.

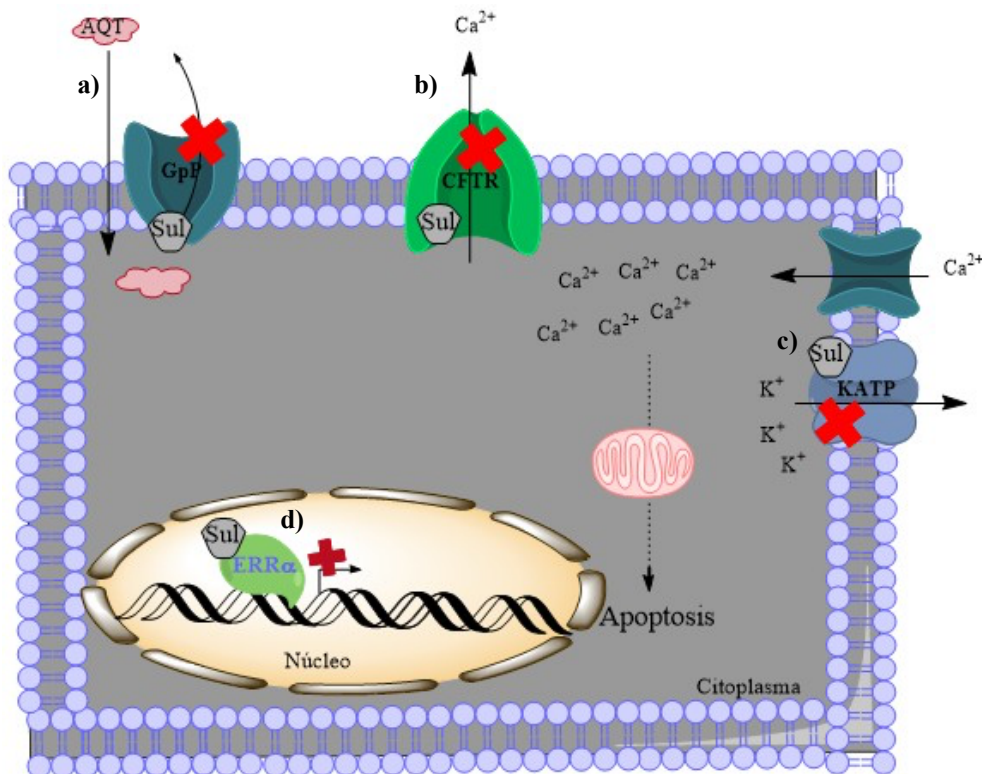


Figura 35. Mecanismo de acción de las sulfonilureas en cáncer. Se ha sugerido que las sulfonilureas (Sul) pueden inhibir a transportadores de la familia ABC, entre ellos: **a)** la glicoproteína P (GpP), cuya inhibición impide el eflujo de agentes quimioterapéuticos (AQT), mientras que la inhibición de **b)** la proteína de regulación de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y **c)** canal potasio dependiente de ATP (KATP) aumentan la concentración de Ca^{2+} citosólico que conlleva a apoptosis por la vía intrínseca. Además, **d)** gliburida y gliquidona, también sulfonilureas, inhiben la actividad transcripcional de $\text{ERR}\alpha$ y posiblemente inducen apoptosis por alteraciones en el metabolismo celular.

Scarsi *et al.* mostraron mediante docking y ensayos de transactivación que algunas sulfonilureas como gliquidona tienen fuerte actividad agonista del receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR γ) [97], un factor de transcripción importante en el metabolismo mitocondrial. El complejo PGC-1 α / PPAR γ tiene un efecto regulatorio sobre ERR α , ya que el promotor de ERR α cuenta con un sitio de unión para PPAR γ [113]. Con esta información es de esperarse que el efecto agonista de gliquidona podría aumentar la expresión de ERR α y posiblemente su actividad transcripcional. No obstante, se evaluó rosiglitazona, un activador bien caracterizado de PPAR γ , por lo que se esperaría un aumento en la expresión de ERR α y posiblemente un aumento en su actividad, sin embargo, nosotros no observamos un aumento o disminución en la señal de luciferasa al compararla con el grupo DMSO. Por el contrario se observó que las sulfonilureas gliburida y gliquidona disminuyen la señal detectada en los ensayos de luciferasa por lo que estos fármacos 1) no podrían estar induciendo la expresión de ERR α , 2) la expresión de ERR α no se correlaciona con su actividad, 3) gliburida y gliquidona actúan como inhibidores directos de ERR α , o bien 4) estos fármacos alteran rutas río arriba de la activación del receptor. Pero, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro tamiz *in silico*, nosotros sugerimos que estos fármacos se unen directamente a ERR α disminuyendo su actividad, o bien que estos fármacos alteran rutas río arriba de la activación del receptor.

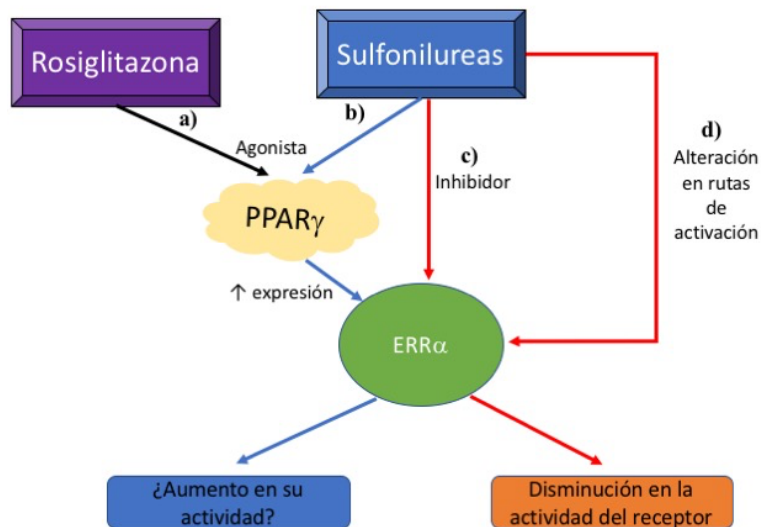


Figura 36. Efecto de sulfonilureas sobre ERR α . a) Rosiglitazona es un agonista de PPAR γ , un factor de transcripción que regula la expresión de ERR α . El efecto agonista de rosiglitazona sobre PPAR γ podría aumentar la expresión de ERR α y posiblemente incrementar la actividad del receptor. Se ha propuesto que b) gliquidona podría ser agonista de PPAR γ por lo tanto puede tener un efecto similar al de rosiglitazona en la actividad de ERR α . En cambio, c) gliburida y gliquidona pueden inhibir directamente a ERR α d) o bien pueden alterar rutas que activan al receptor.

Por su parte imatinib es un fármaco que ha sido reposicionado, ya que inicialmente se aprobó en 2001 para el tratamiento de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) mediante la inhibición de la actividad tirosina quinasa de la proteína BCR-ABL [114–116]. En 2008 este fármaco fue aprobado para el tratamiento de tumores estromales gastrointestinales (GIST) positivos para c-kit (CD117). Cuatro años después, el producto se lanzó en Japón para el tratamiento del síndrome hipereosinofílico avanzado (HES) y/o leucemia eosinofílica crónica (CEL) con el reordenamiento de FIP1L1-PDGFRa y actualmente se encuentra en estudios de fase II para el tratamiento de cáncer de mama [115].

Mediante arreglos de expresión génica en líneas celulares y cultivos primarios de leucemia, se ha reportado que imatinib parece inducir principalmente la vía intrínseca de la apoptosis celular [116]. Posteriores estudios en líneas celulares adherentes, demostraron que el tratamiento con imatinib disminuye la supervivencia celular, genera cambios morfológicos, disminuye la capacidad de adhesión, genera condensación nuclear y fragmentación de la cromatina, mientras que en presencia de un inhibidor de la caspasa-9 los efectos de imatinib son revertidos[117]. Además mediante western blot se mostró que el tratamiento con imatinib disminuye los niveles de procaspasa 9 y procaspasa 3, y aumenta los niveles de caspasa 9 cortada, demostrando un papel central de la caspasa-9 en la apoptosis inducida por imatinib [117]. Cabe mencionar que estos efectos fueron observados a partir de 10 μ M, lo cual es compatible con nuestros resultados, ya que nosotros observamos una disminución de la proliferación a 15 μ M en ambas líneas celulares, aunque SK-BR-3 se inhibió a las 40 horas mientras que MDA-MB-231 a las 60 horas del tratamiento.

El tiempo más corto de inhibición en SK-BR-3 puede asociarse a que la línea celular SK-BR-3 tiene Her2 amplificado. Her2 es un miembro de la familia de receptores tirosina cinasa (TK), que a diferencia de otros miembros de esta familia no requiere dimerización para su actividad, por lo que es constitutivamente activo. Su autofosforilación dentro del dominio citoplasmático desemboca en la activación de cascadas de señalización como las vías ras-raf-MAPK, fosfolipasa C /proteína quinasa C, PI3K/Akt y Jak-Stat. Esto conduce a una mayor proliferación celular y supervivencia. Se ha reportado que imatinib y derivados podrían tener efectos sobre líneas celulares de cáncer anaplásico de tiroides que presentan altos niveles de Her1 y Her2, sugiriendo que imatinib podría tener algún efecto sobre la señalización de estos receptores [118]. Interesantemente en ninguna de estas neoplasias se ha explorado si el efecto antiproliferativo o

apoptótico de imatinib se debe a la interacción de este fármaco con $ERR\alpha$, como sugiere nuestro tamiz *in silico* y de actividad de luciferasa.

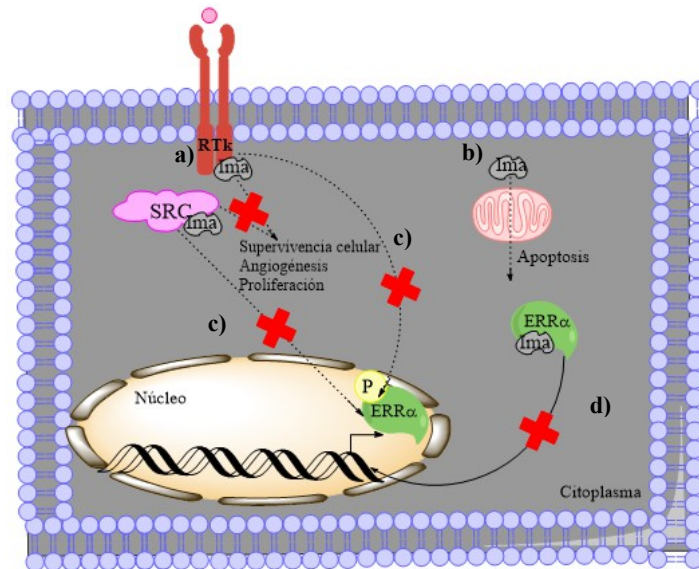


Figura 37. Efecto de Imatinib en células de cáncer. La señalización de receptores tirosina cinasa (RTk) y SRC permiten la supervivencia celular, angiogénesis y proliferación. **a)** Estas proteínas pueden ser inhibidas por Imatinib (Ima) y a su vez su señalización, **b)** generando un efecto apoptótico por vía intrínseca. La señalización de RTk y SRC permiten la fosforilación de $ERR\alpha$, cuya modificación traduccional aumenta la actividad transcripcional del receptor, por lo que es de esperarse que **c)** imatinib disminuya la actividad de $ERR\alpha$ a través de la inhibición de la RTk o SRC, **d)** o bien imatinib puede inhibir de forma directa al receptor como lo sugieren nuestros resultados *in silico*.

No hay reportes que muestren a imatinib como inhibidor de $ERR\alpha$, por lo que los resultados obtenidos serían de gran interés para el reposicionamiento de fármacos y/o búsqueda de un nuevo blanco terapéutico. Cabe mencionar que los experimentos realizados fueron en un sistema complejo como lo es la célula entera, donde se conectan diferentes rutas que desembocan en fenómenos similares como proliferación o apoptosis. A su vez $ERR\alpha$ puede aumentar o disminuir su actividad o expresión por diferentes mecanismos en los cuales algunos de los fármacos evaluados pudieron tener algún efecto diferente a la inhibición directa de $ERR\alpha$. Por ejemplo, SK-BR-3 sobreexpresa a HER2 y la actividad de $ERR\alpha$ puede aumentar al fosforilarse por la señalización de tirosina cinasas (como Her2) a través de las vías MEK/MAPK y PI3K/AKT. Nosotros observamos que dasatinib disminuye la señal en los ensayos de luciferasa en esta línea celular. Este fenómeno puede deberse a que dasatinib es un inhibidor de algunos miembros de tirosina cinasa, cuya inhibición pueda estar afectando la fosforilación de $ERR\alpha$ y a su vez la actividad. Sin embargo estos efectos también fueron observados en la línea celular MDA-MB-231 que no cuenta con la sobreexpresión de HER2, pero existen reportes que muestran sobreexpresión

de la proteína c-Src [119], el cual es un blanco molecular conocido para dasatinib [100], explicando los resultados obtenidos en ambas líneas celulares. Por otro lado se han reportado alteraciones en la actividad de ERR α por la vía Ca²⁺/CaMKK/AMPK [113,120], en la cual podrían estar teniendo algún efecto los fármacos de la predicción *in silico*, pero no fue detectada de forma directa en los experimentos realizados.

Por lo tanto, es importante realizar mayores estudios *in vitro* que nos permitan sustentar los ensayos de luciferasa, como calorimetría de titulación isotérmica o por el sistema de Biacore, los cuales son técnicas libres de células que permiten detectar la unión de un ligando a una proteína.

Conclusiones

- El análisis por acoplamiento molecular *in silico* permitió identificar diez fármacos con afinidad por ERR α . La posición e interacciones son similares a los compuestos reportados con afinidad por el receptor,
- Cinco de estos fármacos fueron probados *in vitro* de los cuales gliburida, gliquidona e imatinib disminuyen la proliferación celular, posiblemente a través de apoptosis.
- La actividad transcripcional y la localización nuclear de ERR α fue disminuida por gliburida y gliquidona. El análisis *in silico* sugiere que este efecto es mediante la inhibición directa de ERR α al unirse a su LBD. Sin embargo, la inhibición de rutas río arriba de la activación del receptor no es descartada
- Los resultados obtenidos en este proyecto permiten sugerir el reposicionamiento de gliburida y gliquidona como agonistas inversos de ERR α , con el potencial de generar una terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer de mama en menor tiempo y costo.

Perspectivas

- Analizar la expresión de ERR α basal y bajo el tratamiento de los fármacos probados con la finalidad de corroborar el efecto de estos sobre ERR α .
- Realizar mayores estudios *in vitro*, incluso estudios libres de células, como calorimetría de titulación isotérmica, para comprobar si algunos de estos fármacos se unen a ERR α .
- En cultivo celular, realizar el silenciamiento de ERR α y evaluar el efecto de estos fármacos sobre la actividad de ERR α así como su proliferación.
- Realizar ensayos de luciferasa bajo el tratamiento de gliburida y gliquidona añadiendo al sistema de plásmidos, uno que contenga la secuencia codificante de PGC-1 α .

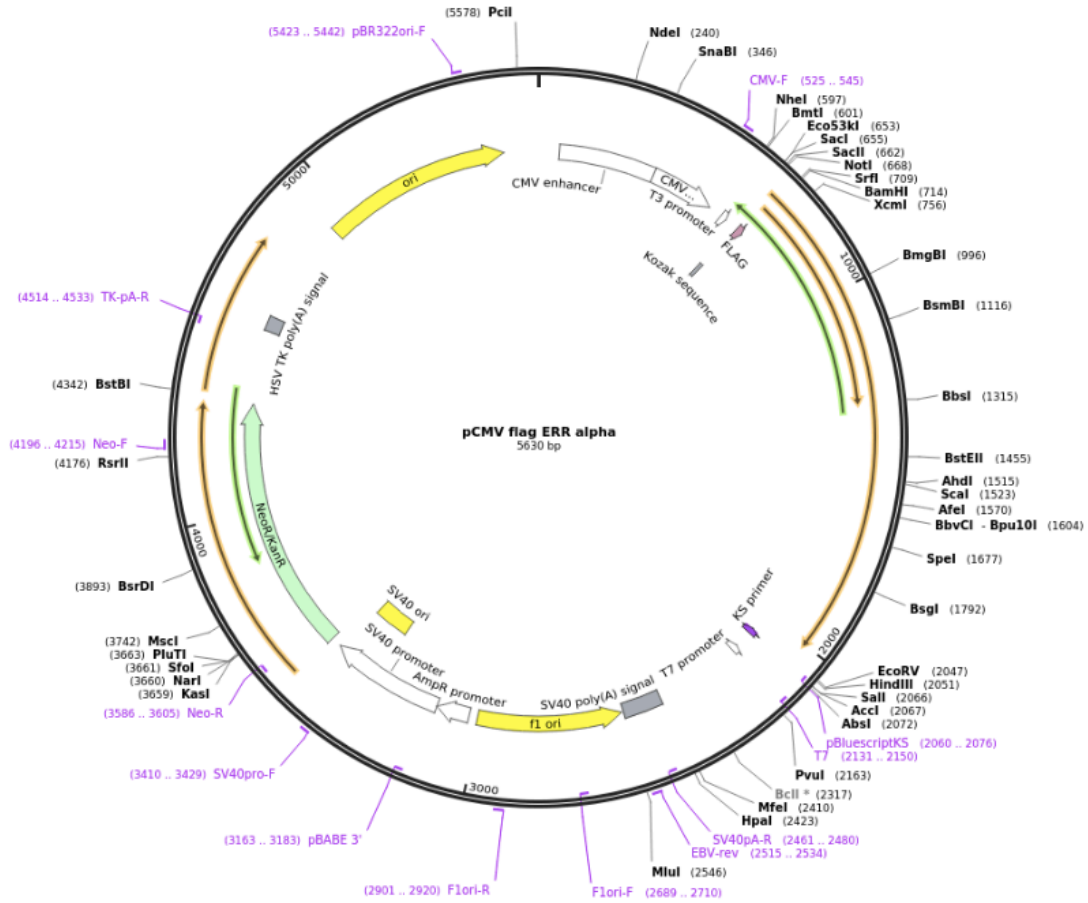
- Evaluar el efecto de los fármacos sobre la viabilidad y muerte celular mediante la tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio, con la finalidad de obtener mayores datos por los cuales algunos de estos disminuyen la proliferación celular.
- Analizar el efecto de los fármacos sobre la proliferación y migración celular en condiciones de privación de nutrientes o de oxígeno.

Anexo 1

Mapa de los plásmidos utilizados en el ensayo de luciferasa

Plásmidos problema

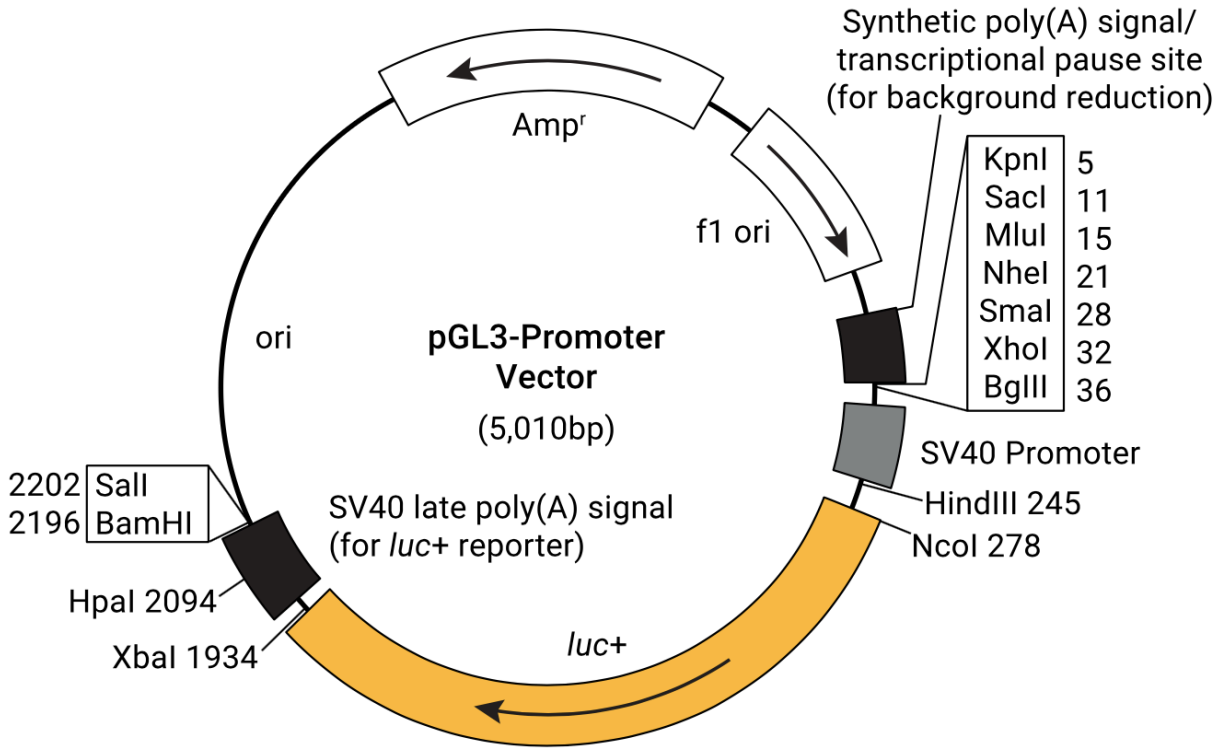
pCMV flag ERR alpha



p3XERRE -luciferase



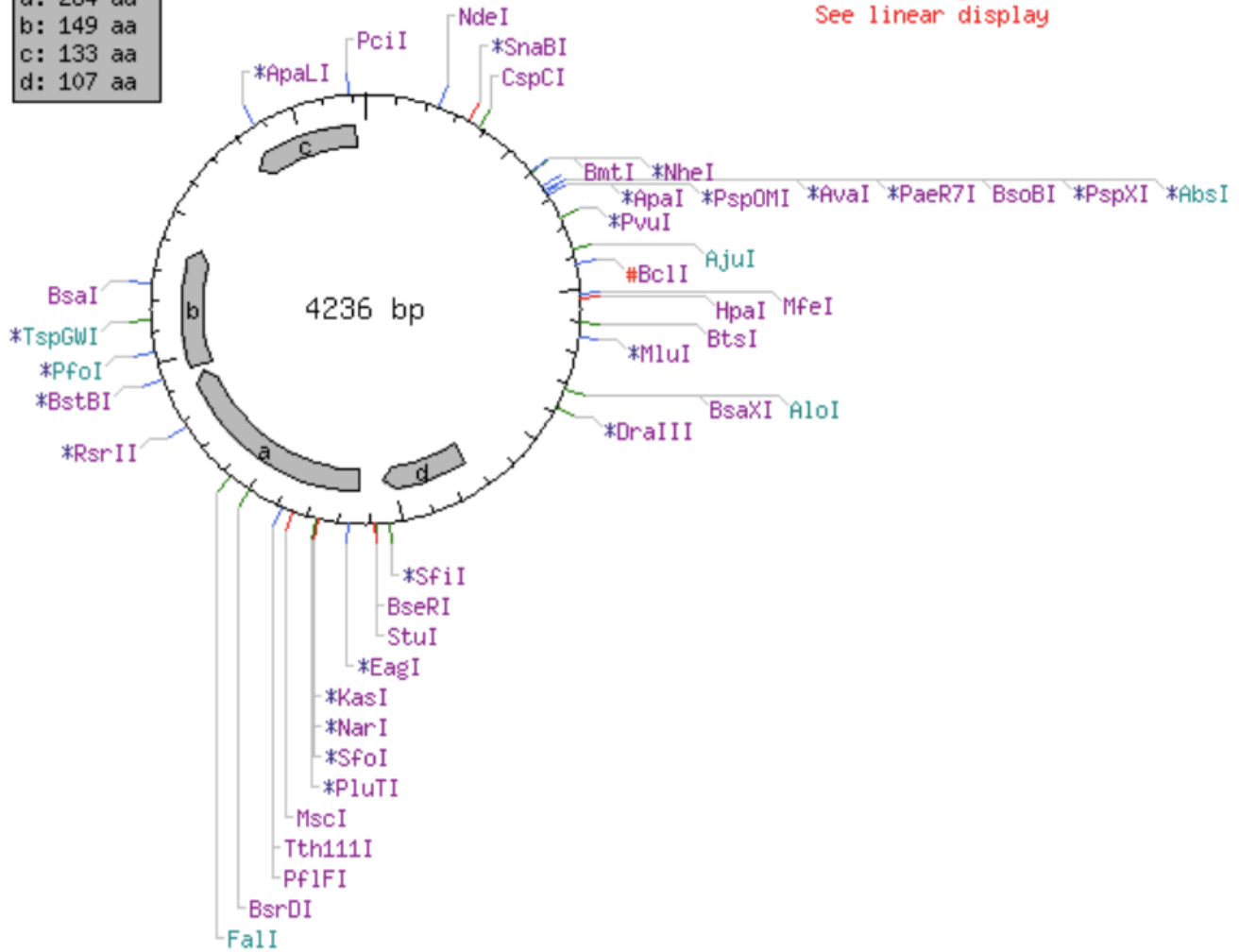
Plásmidos control
pGL3-Promoter



pERR α (-)

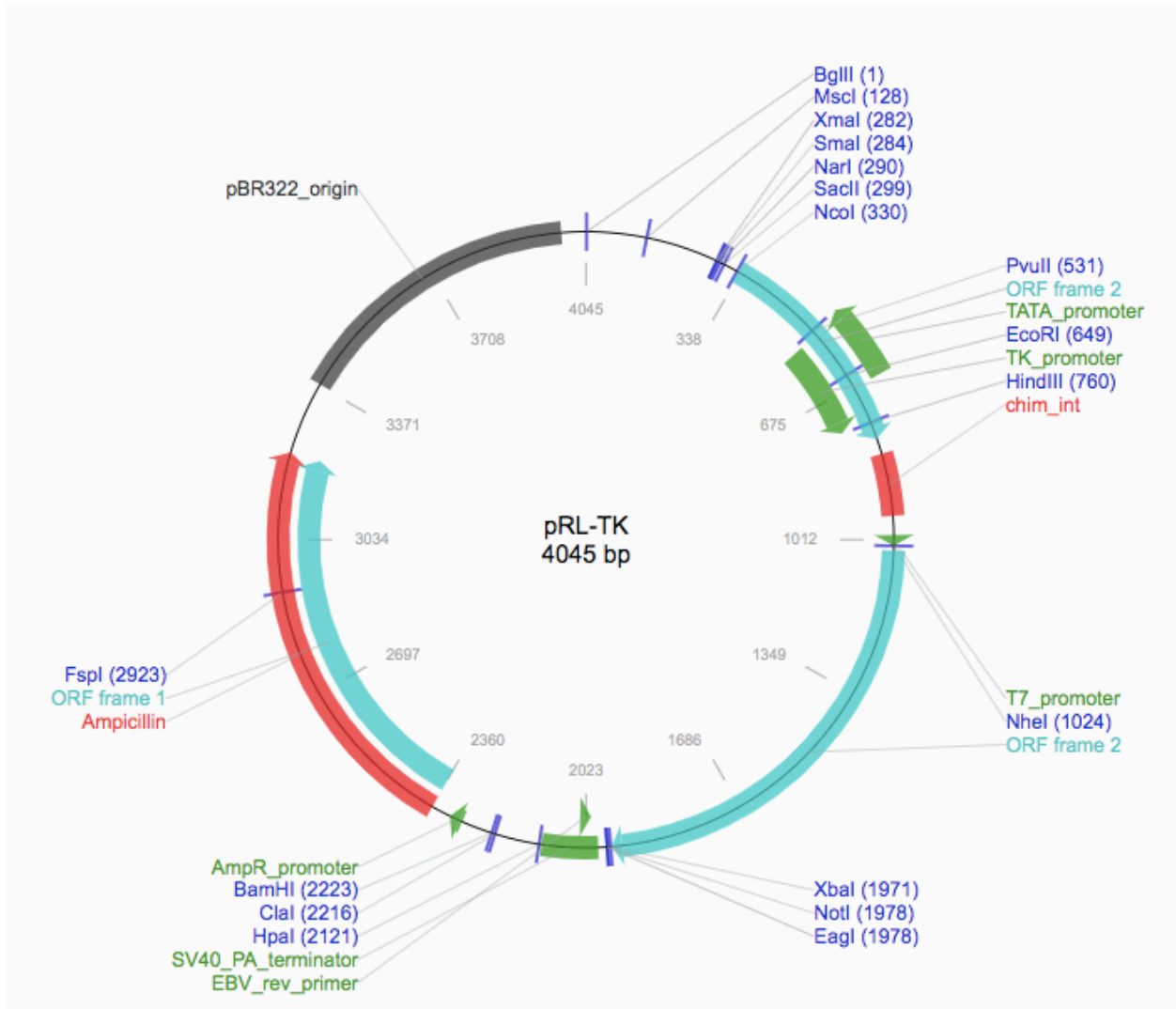
ORFs:	
a:	264 aa
b:	149 aa
c:	133 aa
d:	107 aa

WARNING: Not all enzymes shown
See linear display

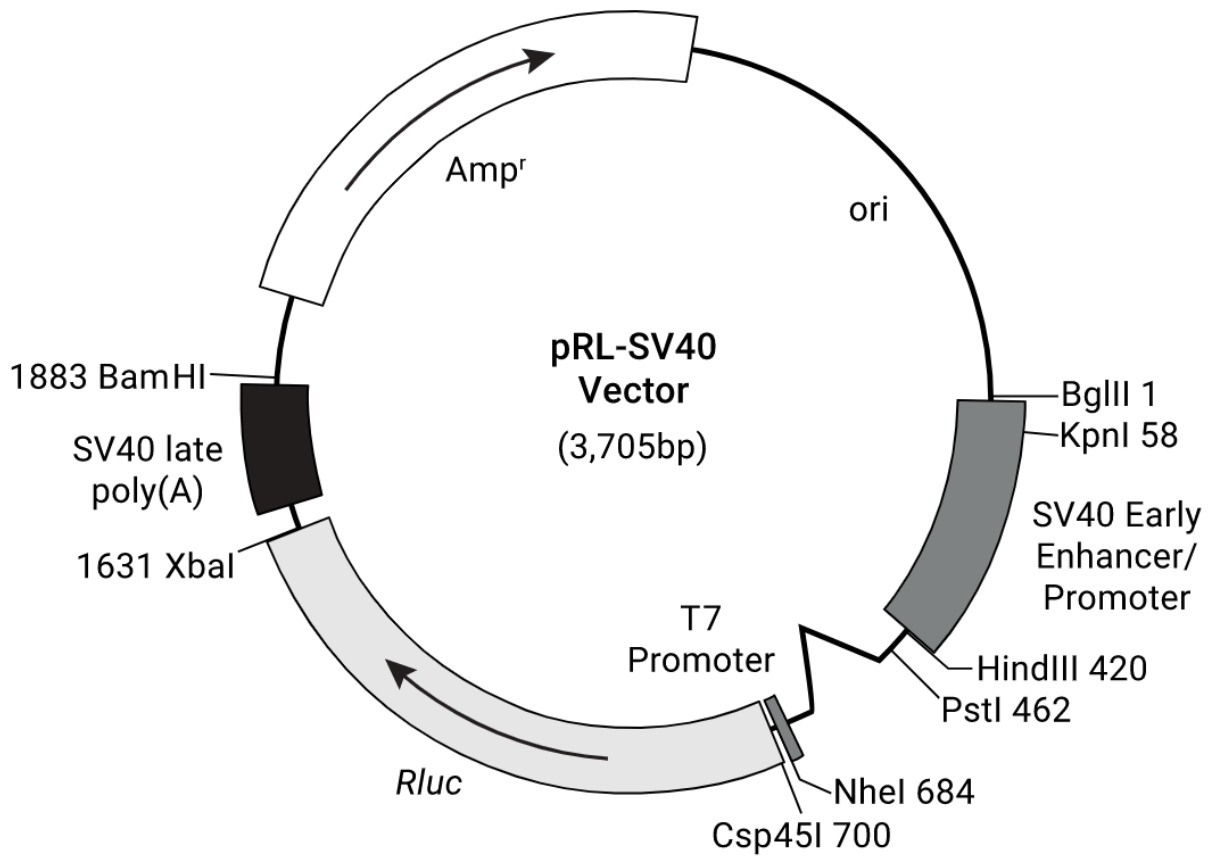


Plásmidos normalizador

pRL-TK



pRL-SV40



Referencias

1. Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (8), 673–683.
2. Shim, J. S.; Liu, J. O. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *Int. J. Biol. Sci.* **2014**, *10* (7), 654.
3. Williams, C. T. Food and Drug Administration Drug Approval Process: A History and Overview. *Nurs. Clin.* **2016**, *51* (1), 1–11.
4. Qu, X. A.; Rajpal, D. K. Applications of Connectivity Map in Drug Discovery and Development. *Drug Discov. Today* **2012**, *17* (23), 1289–1298.
5. Goldstein, I.; Burnett, A. L.; Rosen, R. C.; Park, P. W.; Stecher, V. J. The Serendipitous Story of Sildenafil: An Unexpected Oral Therapy for Erectile Dysfunction. *Sex. Med. Rev.* **2019**, *7* (1), 115–128.
6. Wallis, R. M.; Corbin, J. D.; Francis, S. H.; Ellis, P. Tissue Distribution of Phosphodiesterase Families and the Effects of Sildenafil on Tissue Cyclic Nucleotides, Platelet Function, and the Contractile Responses of Trabeculae Carneae and Aortic Rings in Vitro. *Am. J. Cardiol.* **1999**, *83* (5, Supplement 1), 3–12.
7. Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. Sildenafil: An Orally Active Type 5 Cyclic GMP-Specific Phosphodiesterase Inhibitor for the Treatment of Penile Erectile Dysfunction. *Int. J. Impot. Res.* **1996**, *8* (2), 47–52.
8. Moreland, R. B.; Goldstein, I.; Kim, N. N.; Traish, A. Sildenafil Citrate, a Selective Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor: Research and Clinical Implications in Erectile Dysfunction. *Trends Endocrinol. Metab.* **1999**, *10* (3), 97–104.
9. Boolell, M.; Gepi-Attee, S.; Gingell, J. C.; Allen, M. J. Sildenafil, a Novel Effective Oral Therapy for Male Erectile Dysfunction. *Br. J. Urol.* **1996**, *78* (2), 257–261.
10. Plantone, D.; Koudriavtseva, T. Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review. *Clin. Drug Investig.* **2018**, *38* (8), 653–671.
11. Al-Bari, M. A. A. Chloroquine Analogues in Drug Discovery: New Directions of Uses, Mechanisms of Actions and Toxic Manifestations from Malaria to Multifarious Diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70* (6), 1608–1621.
12. Ben-Zvi, I.; Kivity, S.; Langevitz, P.; Shoenfeld, Y. Hydroxychloroquine: From Malaria to Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2012**, *42* (2), 145–153.
13. Geser, A.; Brubaker, G.; Draper, C. C. Effect of a Malaria Suppression Program on the

- Incidence of African Burkitt's Lymphoma. *Am. J. Epidemiol.* **1989**, *129* (4), 740–752.
14. Klil-Drori, A. J.; Azoulay, L.; Pollak, M. N. Cancer, Obesity, Diabetes, and Antidiabetic Drugs: Is the Fog Clearing? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *14*, 85.
 15. Friberg, E.; Orsini, N.; Mantzoros, C. S.; Wolk, A. Diabetes Mellitus and Risk of Endometrial Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetologia* **2007**, *50* (7), 1365–1374.
 16. Maskarinec, G.; Fontaine, A.; Torfadottir, J. E.; Lipscombe, L. L.; Lega, I. C.; Figueroa, J.; Wild, S. The Relation of Type 2 Diabetes and Breast Cancer Incidence in Asian, Hispanic and African American Populations. 2014;A Review. *Can. J. Diabetes* **2018**, *42* (1), 100–105.
 17. Huxley, R.; Ansary-Moghaddam, A.; Berrington de González, A.; Barzi, F.; Woodward, M. Type-II Diabetes and Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis of 36 Studies. *Br. J. Cancer* **2005**, *92* (11), 2076–2083.
 18. Noto, H.; Goto, A.; Tsujimoto, T.; Noda, M. Cancer Risk in Diabetic Patients Treated with Metformin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **2012**, *7* (3), e33411.
 19. DeCensi, A.; Puntoni, M.; Goodwin, P.; Cazzaniga, M.; Gennari, A.; Bonanni, B.; Gandini, S. Metformin and Cancer Risk in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Prev. Res.* **2010**, *3* (11), 1451 LP – 1461.
 20. Zhang, Z.-J.; Zheng, Z.-J.; Shi, R.; Su, Q.; Jiang, Q.; Kip, K. E. Metformin for Liver Cancer Prevention in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97* (7), 2347–2353.
 21. Wu, L.; Zhu, J.; Prokop, L. J.; Murad, M. H. Pharmacologic Therapy of Diabetes and Overall Cancer Risk and Mortality: A Meta-Analysis of 265 Studies. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10147.
 22. Heckman-Stoddard, B. M.; DeCensi, A.; Sahasrabudhe, V. V.; Ford, L. G. Repurposing Metformin for the Prevention of Cancer and Cancer Recurrence. *Diabetologia* **2017**, *60* (9), 1639–1647.
 23. Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (11), 935–949.
 24. Elokely, K. M.; Doerksen, R. J. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53* (8), 1934–1945.
 25. Muegge, I.; Mukherjee, P. An Overview of Molecular Fingerprint Similarity Search in Virtual Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11* (2), 137–148.

26. Kumar, A.; Zhang, K. Y. J. Advances in the Development of Shape Similarity Methods and Their Application in Drug Discovery. *Frontiers in Chemistry*. 2018, p 315.
27. Venhorst, J.; Núñez, S.; Terpstra, J. W.; Kruse, C. G. Assessment of Scaffold Hopping Efficiency by Use of Molecular Interaction Fingerprints. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (11), 3222–3229.
28. Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Nicholls, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (1), 74–82.
29. Sperandio, O.; Andrieu, O.; Miteva, M. A.; Vo, M.-Q.; Souaille, M.; Delfaud, F.; Villoutreix, B. O. MED-SuMoLig: A New Ligand-Based Screening Tool for Efficient Scaffold Hopping. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47* (3), 1097–1110.
30. Vainio, M. J.; Puranen, J. S.; Johnson, M. S. ShaEP: Molecular Overlay Based on Shape and Electrostatic Potential. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (2), 492–502.
31. Bauer, R. A.; Bourne, P. E.; Formella, A.; Frömmel, C.; Gille, C.; Goede, A.; Guerler, A.; Hoppe, A.; Knapp, E.-W.; Pöschel, T.; et al. Superimposé: A 3D Structural Superposition Server. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (suppl_2), W47–W54.
32. Grotthuss, M. v.; Koczyk, G.; Pas, J.; Wyrwicz, L. S.; Rychlewski, L. Ligand. Info Small-Molecule Meta-Database. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2004**, *7* (8), 757–761.
33. Girke, T.; Cheng, L.-C.; Raikhel, N. ChemMine. A Compound Mining Database for Chemical Genomics. *Plant Physiol.* **2005**, *138* (2), 573 LP – 577.
34. Banegas-Luna, A.-J.; Cerón-Carrasco, J. P.; Pérez-Sánchez, H. A Review of Ligand-Based Virtual Screening Web Tools and Screening Algorithms in Large Molecular Databases in the Age of Big Data. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (22), 2641–2658.
35. WHO | Breast cancer <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en>. (accessed Oct 19, 2019).
36. INEGI, A Propósito Del Día Internacional Contra El Cáncer De Mama (19 de Octubre). **2018**, 1–16.
37. Blows, F. M.; Driver, K. E.; Schmidt, M. K.; Broeks, A.; van Leeuwen, F. E.; Wesseling, J.; Cheang, M. C.; Gelmon, K.; Nielsen, T. O.; Blomqvist, C.; et al. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLOS Med.* **2010**, *7* (5), e1000279.
38. Nielsen, T. O.; Hsu, F. D.; Jensen, K.; Cheang, M.; Karaca, G.; Hu, Z.; Hernandez-Boussard, T.; Livasy, C.; Cowan, D.; Dressler, L.; et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin.*

- Cancer Res.* **2004**, *10* (16), 5367 LP – 5374.
39. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70.
 40. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674.
 41. Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8* (6), 519–530.
 42. Levine, A. J.; Puzio-Kuter, A. M. The Control of the Metabolic Switch in Cancers by Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Science (80-.)*. **2010**, *330* (6009), 1340 LP – 1344.
 43. Ferreira, L. M. R. Cancer Metabolism: The Warburg Effect Today. *Exp. Mol. Pathol.* **2010**, *89* (3), 372–380.
 44. Wu, M.; Neilson, A.; Swift, A. L.; Moran, R.; Tamagnine, J.; Parslow, D.; Armistead, S.; Lemire, K.; Orrell, J.; Teich, J.; et al. Multiparameter Metabolic Analysis Reveals a Close Link between Attenuated Mitochondrial Bioenergetic Function and Enhanced Glycolysis Dependency in Human Tumor Cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2007**, *292* (1), C125–C136.
 45. Schulze, A.; Harris, A. L. How Cancer Metabolism Is Tuned for Proliferation and Vulnerable to Disruption. *Nature* **2012**, *491*, 364.
 46. Challapalli, A.; Aboagye, E. O. Positron Emission Tomography Imaging of Tumor Cell Metabolism and Application to Therapy Response Monitoring . *Frontiers in Oncology* . 2016, p 44.
 47. Geudens, I.; Gerhardt, H. Coordinating Cell Behaviour during Blood Vessel Formation. *Development* **2011**, *138* (21), 4569 LP – 4583.
 48. Jain, R. K. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science (80-.)*. **2005**, *307* (5706), 58 LP – 62.
 49. Gilkes, D. M.; Semenza, G. L. Role of Hypoxia-Inducible Factors in Breast Cancer Metastasis. *Futur. Oncol.* **2013**, *9* (11), 1623–1636.
 50. Ao, A.; Wang, H.; Kamarajugadda, S.; Lu, J. Involvement of Estrogen-Related Receptors in Transcriptional Response to Hypoxia and Growth of Solid Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (22), 7821 LP – 7826.
 51. Baek, S. H.; Kim, K. Il. Emerging Roles of Orphan Nuclear Receptors in Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2014**, *76* (1), 177–195.
 52. Giguère, V. To ERR in the Estrogen Pathway. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2002, pp 220–225.

53. Giguère, V. Transcriptional Control of Energy Homeostasis by the Estrogen-Related Receptors. *Endocrine Reviews*. October 2008, pp 677–696.
54. Barry, J. B.; Laganière, J.; Giguère, V. A Single Nucleotide in an Estrogen-Related Receptor α Site Can Dictate Mode of Binding and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 α Activation of Target Promoters. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20* (2), 302–310.
55. Ghanbari, F.; Hebert-Losier, A.; Barry, J.; Poirier, D.; Giguere, V.; Mader, S.; Philip, A. Isolation and Functional Characterization of a Novel Endogenous Inverse Agonist of Estrogen Related Receptors (ERRs) from Human Pregnancy Urine. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *191*, 105352.
56. Deblois, G.; Giguère, V. Oestrogen-Related Receptors in Breast Cancer: Control of Cellular Metabolism and Beyond. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *13*, 27.
57. Ariazi, E. A.; Clark, G. M.; Mertz, J. E. Estrogen-Related Receptor α and Estrogen-Related Receptor γ Associate with Unfavorable and Favorable Biomarkers, Respectively, in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* **2002**, *62* (22), 6510 LP – 6518.
58. Suzuki, T.; Miki, Y.; Moriya, T.; Shimada, N.; Ishida, T.; Hirakawa, H.; Ohuchi, N.; Sasano, H. Estrogen-Related Receptor α in Human Breast Carcinoma as a Potent Prognostic Factor. *Cancer Res.* **2004**, *64* (13), 4670–4676.
59. Jarzabek, K.; Koda, M.; Kozlowski, L.; Sulkowski, S.; Kottler, M. L.; Wolczynski, S. The Significance of the Expression of ERR α as a Potential Biomarker in Breast Cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *113* (1–2), 127–133.
60. Chang, C. yi; Kazmin, D.; Jasper, J. S.; Kunder, R.; Zuercher, W. J.; McDonnell, D. P. The Metabolic Regulator ERR α , a Downstream Target of HER2/IGF-1R, as a Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancer Cell* **2011**, *20* (4), 500–510.
61. Barry, J. B.; Giguère, V. Epidermal Growth Factor-Induced Signaling in Breast Cancer Cells Results in Selective Target Gene Activation by Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α . *Cancer Res.* **2005**, *65* (14), 6120–6129.
62. Ariazi, E. A.; Kraus, R. J.; Farrell, M. L.; Jordan, V. C.; Mertz, J. E. Estrogen-Related Receptor A1 Transcriptional Activities Are Regulated in Part via the ErbB2/HER2 Signaling Pathway. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5* (1), 71–85.
63. Gatzka, M. L.; Kung, H. N.; Blackwell, K. L.; Dewhirst, M. W.; Marks, J. R.; Chi, J. T. Analysis of Tumor Environmental Response and Oncogenic Pathway Activation Identifies Distinct Basal and Luminal Features in HER2-Related Breast Tumor Subtypes. *Breast Cancer Res.* **2011**, *13* (3).

64. Ao, A.; Wang, H.; Kamarajugadda, S.; Lu, J. Involvement of Estrogen-Related Receptors in Transcriptional Response to Hypoxia and Growth of Solid Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (22), 7821–7826.
65. Harris, A. L. Hypoxia - A Key Regulatory Factor in Tumour Growth. *Nature Reviews Cancer*. January 2002, pp 38–47.
66. Höckel, M.; Vaupel, P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *Journal of the National Cancer Institute*. Oxford University Press February 21, 2001, pp 266–276.
67. Ao, A.; Wang, H.; Kamarajugadda, S.; Lu, J. Involvement of Estrogen-Related Receptors in Transcriptional Response to Hypoxia and Growth of Solid Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (22), 7821–7826.
68. González, F.; Coughtrie, M.; Tukey, R. H. *Metabolismo de Los Fármacos. En: Brunton L, Chabner B, Knollman B, Eds. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de La Terapéutica*; México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2012.
69. Deblois, G.; Giguère, V. Oestrogen-Related Receptors in Breast Cancer: Control of Cellular Metabolism and Beyond. *Nature Reviews Cancer*. January 2013, pp 27–36.
70. Huss, J. M.; Imahashi, K. ichi; Dufour, C. R.; Weinheimer, C. J.; Courtois, M.; Kovacs, A.; Giguère, V.; Murphy, E.; Kelly, D. P. The Nuclear Receptor ERR α Is Required for the Bioenergetic and Functional Adaptation to Cardiac Pressure Overload. *Cell Metab.* **2007**, *6* (1), 25–37.
71. Dwyer, M. A.; Joseph, J. D.; Wade, H. E.; Eaton, M. L.; Kunder, R. S.; Kazmin, D.; Chang, C. Y.; McDonnell, D. P. WNT11 Expression Is Induced by Estrogen-Related Receptor α and β -Catenin and Acts in an Autocrine Manner to Increase Cancer Cell Migration. *Cancer Res.* **2010**, *70* (22), 9298–9308.
72. Kallen, J.; Lattmann, R.; Beerli, R.; Blechschmidt, A.; Blommers, M. J. J.; Geiser, M.; Ottl, J.; Schlaeppli, J.-M.; Strauss, A.; Fournier, B. Crystal Structure of Human Estrogen-Related Receptor Alpha in Complex with a Synthetic Inverse Agonist Reveals Its Novel Molecular Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (32), 23231–23239.
73. Michel, M. C.; Seifert, R. Selectivity of Pharmacological Tools: Implications for Use in Cell Physiology. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2015**, *308* (7), C505–C520.
74. Kenakin, T. Efficacy as a Vector: The Relative Prevalence and Paucity of Inverse Agonism. *Molecular Pharmacology*. January 2004, pp 2–11.
75. Patch, R. J.; Searle, L. L.; Kim, A. J.; De, D.; Zhu, X.; Askari, H. B.; O'Neill, J. C.; Abad,

- M. C.; Rentzeperis, D.; Liu, J.; et al. Identification of Diaryl Ether-Based Ligands for Estrogen-Related Receptor α as Potential Antidiabetic Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (3), 788–808.
76. Kallen, J.; Lattmann, R.; Beerli, R.; Blechschmidt, A.; Blommers, M. J. J.; Geiser, M.; Ottl, J.; Schlaeppli, J. M.; Strauss, A.; Fournier, B. Crystal Structure of Human Estrogen-Related Receptor α in Complex with a Synthetic Inverse Agonist Reveals Its Novel Molecular Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (32), 23231–23239.
77. Eskiocak, B.; Ali, A.; White, M. A. The Estrogen-Related Receptor α Inverse Agonist XCT 790 Is a Nanomolar Mitochondrial Uncoupler. *Biochemistry* **2014**, *53* (29), 4839–4846.
78. Greschik, H.; Althage, M.; Flaig, R.; Sato, Y.; Chavant, V.; Peluso-Iltis, C.; Choulier, L.; Cronet, P.; Rochel, N.; Schüle, R.; et al. Communication between the ERR α Homodimer Interface and the PGC-1 α Binding Surface via the Helix 8-9 Loop. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (29), 20220–20230.
79. Busch, B. B.; Stevens, W. C.; Martin, R.; Ordentlich, P.; Zhou, S.; Sapp, D. W.; Horlick, R. A.; Mohan, R. Identification of a Selective Inverse Agonist for the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α . *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (23), 5593–5596.
80. Busch, B. B.; Stevens, W. C.; Martin, R.; Ordentlich, P.; Zhou, S.; Sapp, D. W.; Horlick, R. A.; Mohan, R. Identification of a Selective Inverse Agonist for the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α . *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (23), 5593–5596.
81. Eskiocak, B.; Ali, A.; White, M. A. The Estrogen-Related Receptor α Inverse Agonist XCT 790 Is a Nanomolar Mitochondrial Uncoupler. *Biochemistry* **2014**, *53* (29), 4839–4846.
82. Irwin, J. J.; Sterling, T.; Mysinger, M. M.; Bolstad, E. S.; Coleman, R. G. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (7), 1757–1768.
83. May, F. E. Novel Drugs That Target the Estrogen-Related Receptor Alpha: Their Therapeutic Potential in Breast Cancer. *Cancer Manag. Res.* **2014**, *6*, 225–252.
84. Kallen, J.; Schlaeppli, J.-M.; Bitsch, F.; Filipuzzi, I.; Schilb, A.; Riou, V.; Graham, A.; Strauss, A.; Geiser, M.; Fournier, B. Evidence for Ligand-Independent Transcriptional Activation of the Human Estrogen-Related Receptor α (ERR α): Crystal Structure of Err α Ligand Binding Domain in Complex with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Coactivator-1 α . *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (47), 49330–49337.
85. Patch, R. J.; Searle, L. L.; Kim, A. J.; De, D.; Zhu, X.; Askari, H. B.; O'Neill, J. C.; Abad, M. C.; Rentzeperis, D.; Liu, J.; et al. Identification of Diaryl Ether-Based Ligands for Estrogen-Related Receptor α as Potential Antidiabetic Agents. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*

- (3), 788–808.
86. Greschik, H.; Althage, M.; Flaig, R.; Sato, Y.; Chavant, V.; Peluso-Iltis, C.; Choulier, L.; Cronet, P.; Rochel, N.; Schüle, R.; et al. Communication between the ERR α Homodimer Interface and the PGC-1 α Binding Surface via the Helix 8–9 Loop. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (29), 20220–20230.
 87. Kallen, J.; Lattmann, R.; Beerli, R.; Blechschmidt, A.; Blommers, M. J. J.; Geiser, M.; Ottl, J.; Schlaeppli, J.-M.; Strauss, A.; Fournier, B. Crystal Structure of Human Estrogen-Related Receptor α in Complex with a Synthetic Inverse Agonist Reveals Its Novel Molecular Mechanism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (32), 23231–23239.
 88. Shiau, A. K.; Barstad, D.; Loria, P. M.; Cheng, L.; Kushner, P. J.; Agard, D. A.; Greene, G. L. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell* **1998**, *95* (7), 927–937.
 89. Busch, B. B.; Stevens, William C.; Martin, R.; Ordentlich, P.; Zhou, S.; Sapp, D. W.; Horlick, R. A.; Mohan, R. Identification of a Selective Inverse Agonist for the Orphan Nuclear Receptor Estrogen-Related Receptor α . *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (23), 5593–5596.
 90. Giguère, V. To ERR in the Estrogen Pathway. *Trends Endocrinol. Metab.* **2002**, *13* (5), 220–225.
 91. Promega. Which pRL Vector should I use for a Dual-Luciferase® Reporter Assay?
 92. Behre, G.; Smith, L. T.; Tenen, D. G. Use of a Promoterless Renilla Luciferase Vector as an Internal Control Plasmid for Transient Co-Transfection Assays of Ras-Mediated Transcription Activation. *Biotechniques* **1999**, *26* (1), 24–28.
 93. Cooper, P. E.; McClenaghan, C.; Chen, X.; Sary-Weinzinger, A.; Nichols, C. G. Conserved Functional Consequences of Disease-Associated Mutations in the Slide-Helix of Kir6.1 and Kir6.2 Subunits of the ATP-Sensitive Potassium Channel. *J. Biol. Chem.* **2017**.
 94. Ishimaru, M.; Yusuke, N.; Tsukimoto, M.; Harada, H.; Takenouchi, T.; Kitani, H.; Kojima, S. Purinergic Signaling via P2Y Receptors Up-Mediates IL-6 Production by Liver Macrophages/Kupffer Cells. *J. Toxicol. Sci.* **2014**, *39* (3), 413–423.
 95. Lee, K. W.; Ku, Y. H.; Kim, M.; Ahn, B. Y.; Chung, S. S.; Park, K. S. Effects of Sulfonylureas on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activity and on Glucose Uptake by Thiazolidinediones. *Diabetes Metab J* **2011**, *35* (4), 340–347.
 96. Scarsi, M.; Podvinec, M.; Roth, A.; Hug, H.; Kersten, S.; Albrecht, H.; Schwede, T.; Meyer, U. A.; Rücker, C. Sulfonylureas and Glinides Exhibit Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activity: A Combined Virtual Screening and Biological Assay

- Approach. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71* (2), 398 LP – 406.
97. Seto-Young, D.; Paliou, M.; Schlosser, J.; Avtanski, D.; Park, A.; Patel, P.; Holcomb, K.; Chang, P.; Poretsky, L. Direct Thiazolidinedione Action in the Human Ovary: Insulin-Independent and Insulin-Sensitizing Effects on Steroidogenesis and Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-1 Production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (11), 6099–6105.
 98. Lin, C.-F.; Young, K.-C.; Bai, C.-H.; Yu, B.-C.; Ma, C.-T.; Chien, Y.-C.; Chiang, C.-L.; Liao, C.-S.; Lai, H.-W.; Tsao, C.-W. Rosiglitazone Regulates Anti-Inflammation and Growth Inhibition via PTEN. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*.
 99. Fraser, C.; Dawson, J. C.; Dowling, R.; Houston, D. R.; Weiss, J. T.; Munro, A. F.; Muir, M.; Harrington, L.; Webster, S. P.; Frame, M. C.; et al. Rapid Discovery and Structure–Activity Relationships of Pyrazolopyrimidines That Potently Suppress Breast Cancer Cell Growth via SRC Kinase Inhibition with Exceptional Selectivity over ABL Kinase. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 4697–4710.
 100. Johnson, F. M.; Saigal, B.; Talpaz, M.; Donato, N. J. Dasatinib (BMS-354825) Tyrosine Kinase Inhibitor Suppresses Invasion and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Non–Small Cell Lung Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (19), 6924 LP – 6932.
 101. Motawi, T. M. K.; Sadik, N. A. H.; Fahim, S. A.; Shouman, S. A. Combination of Imatinib and Clotrimazole Enhances Cell Growth Inhibition in T47D Breast Cancer Cells. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *233*, 147–156.
 102. Jönsson, S.; Hjorth-Hansen, H.; Olsson, B.; Wadenvik, H.; Sundan, A.; Standal, T. Imatinib Inhibits Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells and Promotes Early but Not Late Osteoblast Differentiation in Vitro. *J. Bone Miner. Metab.* **2012**, *30* (1), 119–123.
 103. Huss, J. M.; Torra, I. P.; Staels, B.; Giguère, V.; Kelly, D. P. Estrogen-Related Receptor α Directs Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Signaling in the Transcriptional Control of Energy Metabolism in Cardiac and Skeletal Muscle. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24* (20), 9079 LP – 9091.
 104. Integrity.Clarivate. Gliquidone (accessed Jan 10, 2020).
 105. Pubchem. Gliquidone.
 106. Gao, R.; Yang, T.; Xu, W. Enemies or Weapons in Hands: Investigational Anti-Diabetic Drug Glibenclamide and Cancer Risk. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2017**, *26* (7), 853–864.

107. Hait, W. N.; Yang, J.-M. Clinical Management of Recurrent Breast Cancer: Development of Multidrug Resistance (MDR) and Strategies to Circumvent It. *Semin. Oncol.* **2005**, *32*, 16–21.
108. Leonard, G. D.; Fojo, T.; Bates, S. E. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncol.* **2003**, *8* (5), 411–424.
109. Golstein, P. E.; Boom, A.; van Geffel, J.; Jacobs, P.; Masereel, B.; Beauwens, R. P-Glycoprotein Inhibition by Glibenclamide and Related Compounds. *Pflügers Arch.* **1999**, *437* (5), 652–660.
110. Schultz, B. D.; Singh, A. K.; Devor, D. C.; Bridges, R. J. Pharmacology of CFTR Chloride Channel Activity. *Physiol. Rev.* **1999**, *79* (1), S109–S144.
111. Kim, J.-A.; Kang, Y. S.; Lee, S. H.; Lee, E.-H.; Yoo, B. H.; Lee, Y. S. Glibenclamide Induces Apoptosis through Inhibition of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Cl⁻ Channels and Intracellular Ca²⁺ Release in HepG2 Human Hepatoblastoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *261* (3), 682–688.
112. Choi, Y. K.; Kim, J.-H.; Lee, D.-K.; Lee, K.-S.; Won, M.-H.; Jeoung, D.; Lee, H.; Ha, K.-S.; Kwon, Y.-G.; Kim, Y.-M. Carbon Monoxide Potentiation of L-Type Ca²⁺ Channel Activity Increases HIF-1 α -Independent VEGF Expression via an AMPK α /SIRT1-Mediated PGC-1 α /ERR α Axis. *Antioxid. Redox Signal.* **2016**, *27* (1), 21–36.
113. Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B. Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr–Abl Positive Cells. *Nat. Med.* **1996**, *2* (5), 561–566.
114. Integrity.Clarivate. Imatinib mesylate
https://integrity.clarivate.com/integrity/xmlxsl/pk_prod_list.xml_prod_list_card_pr?p_id=229058&p_tsearch=A (accessed Sep 20, 2010).
115. Du, Y.; Wang, K.; Fang, H.; Li, J.; Xiao, D.; Zheng, P.; Chen, Y.; Fan, H.; Pan, X.; Zhao, C.; et al. Coordination of Intrinsic, Extrinsic, and Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis by Imatinib Mesylate Combined with Arsenic Trioxide in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **2006**, *107* (4), 1582–1590.
116. Kang Chen, Qiao Ren, Xiao-Rui, Han Xiao-Nan, Zhang Bo, W. X.-Z. B. Imatinib Mesylate Induces Mitochondria-Dependent Apoptosis and Inhibits Invasion of Human Pigmented Villonodular Synovitis Fibroblast-like Synovial Cells. *Oncol. Rep.* **2016**, *35* (1), 197–204.
117. Kurebayashi, J.; Okubo, S.; Yamamoto, Y.; Ikeda, M.; Tanaka, K.; Otsuki, T.; Sonoo, H. Additive Antitumor Effects of Gefitinib and Imatinib on Anaplastic Thyroid Cancer Cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58* (4), 460–470.

118. Biscardi, J. S.; Belsches, A. P.; Parsons, S. J. Characterization of Human Epidermal Growth Factor Receptor and C-Src Interactions in Human Breast Tumor Cells. *Mol. Carcinog.* **1998**, *21* (4), 261–272.
119. Choi, Y. K.; Park, J. H.; Yun, J.-A.; Cha, J.-H.; Kim, Y.; Won, M.-H.; Kim, K.-W.; Ha, K.-S.; Kwon, Y.-G.; Kim, Y.-M. Heme Oxygenase Metabolites Improve Astrocytic Mitochondrial Function via a Ca²⁺-Dependent HIF-1 α /ERR α Circuit. *PLoS One* **2018**, *13* (8), e0202039.