

**La Universidad Autónoma de Baja California
Instituto de Ingeniería**



**"Evaluación de la actividad de dos triazaspiranos como
inhibidores de la migración e invasión en células
tumORAles prostáticas PC3"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

PRESENTA

JAVIER DE JESUS VASCONCELOS ULLOA

DIRECTORES DE TESIS

DR. EN C. RAÚL DÍAZ MOLINA

DR. EN C. OCTAVIO GALINDO HERNÁNDEZ

MEXICALI, B.C.

DICIEMBRE DE 2023

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ingeniería

"Evaluación de la actividad de dos triazaspiranos como inhibidores de la migración e invasión en células tumorales prostáticas PC3"

Autor de la tesis

MCS. Javier de Jesus Vasconcelos Ulloa

Universidad Autónoma de Baja California

Mexicali, Baja California

Tutores y Directores de Tesis

Dr. Raúl Díaz Molina

Coordinador de Posgrado e Investigación

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Baja California

Mexicali, Baja California

Dr. Octavio Galindo Hernández

Facultad de Medicina Mexicali

Universidad Autónoma de Baja California

Mexicali, Baja California

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, gracias a su guía he podido realizar este trabajo.

A mi esposa Alejandra, te agradezco por siempre estar a mi lado y apoyarme con tu gracia y amor durante este tiempo, solo tú sabes los sacrificios que hemos realizado para alcanzar este logro juntos.

A mis padres Javier e Irma, lo aprendido de ustedes me tiene en este camino, el ejemplo de disciplina y la voluntad para salir adelante, es lo más valioso que me han otorgado, gracias por su cariño incondicional.

A mis hermanos, León gracias por siempre tener una sonrisa para mí, por ser luz en mis días difíciles, Iram tu compañía en este viaje es invaluable, eres un pilar de motivación que me impulsa a ver nuevos horizontes.

A mi tío Oscar, formas parte de todos mis logros, la distancia nunca quebrantará el vínculo que tenemos, eres mi hermano mayor y tu consejo es y será parte de quien soy.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), por convertirse en un hogar durante estos años, apoyando mi crecimiento profesional y personal de una forma plena y completa.

Al Instituto de Ingeniería de la UABC, por contribuir con mi formación, alentarme en diversos momentos y las innumerables muestras de atención y apoyo durante todo este proceso.

Facultad de Medicina Mexicali de la UABC, por la completa disposición a apoyar mi trabajo de investigación, brindado sus instalaciones, recursos y tiempo de distintas personas que pertenecen a la Facultad, en favor de alcanzar mis objetivos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por creer en mi proyecto de investigación y brindar un apoyo de principio a fin durante este proceso.

Al Dr. Raúl Díaz, su apoyo durante todos estos años ha sido crucial en mi desarrollo profesional, le agradezco sus consejos y la confianza para forjar mi camino en la investigación.

Al Dr. Octavio Galindo, sus enseñanzas y guía fueron determinantes para realizar esta investigación, la paciencia y el conocimiento que aportó lo valoro mucho.

Al Dr. Víctor González, su disposición para siempre aportar y buscar mejoras en la investigación.

Al Dr. Benjamín Valdez, por su asesoría y retroalimentación durante el proceso de formación y elaboración de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio, a todos los que han formado parte del equipo de trabajo del laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina Mexicali durante estos años que se llevó a cabo la investigación, les agradezco su apoyo en las distintas situaciones que llegamos a laborar y convivir.

CONTENIDO

Abreviaturas	9
Lista de tablas	12
Lista de figuras	13
Resumen	15
Abstract	16
1. Introducción	17
1.1 Antecedentes	20
1.2 Planteamiento del problema	23
1.3 Justificación	25
1.4 Hipótesis	26
1.5 Objetivos	26
1.5.1 Objetivo general	26
1.5.2 Objetivo específico	26
2. Marco teorico.....	28
2.1 Cáncer	28
2.1.1 Definición y características	28
2.1.2 Epidemiología	29
2.1.3 Fisiopatología del cáncer	29
2.2 Cáncer de próstata	30
2.2.1 Definición	30
2.2.2 Anatomía	30
2.2.3 Factores de riesgo del cáncer de próstata	31
2.2.4 Estadificación del cáncer de próstata	33

2.2.4.1 Clasificación TNM.....	34
2.2.4.2 Sistema de puntuación de Gleason.....	35
2.2.5 Tratamiento	36
2.2.5.1 Cirugía	36
2.2.5.2 Prostatectomía radical.....	36
2.2.5.3 Radioterapia	37
2.2.5.4 Terapia hormonal	37
2.3 Cáncer y genética	37
2.4 Vías de señalización en cáncer	38
2.4.1 Vía MAPK.....	39
2.4.2 Vía PI3K/Akt	40
2.4.3 Vía FAK/Src.....	40
2.5 Adhesión celular	41
2.6 Migración celular	44
2.7 Invasión celular y metástasis.....	45
2.8 Regla de los 5 de Lipinski.....	46
2.8 Docking molecular.....	47
2.9 Compuestos de tipo espiro-hidantoína	48
3. Metodología.....	50
3.1 Primera etapa.....	51
3.1.1 Docking molecular	51
3.1.2 Preparación de los compuestos (TRI-SR y TRI-BE).....	51
3.2 Segunda etapa	52
3.2.1 Ensayo MTT	52

3.2.2 Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”	52
3.2.3 Ensayo de invasión en cámara de Boyden	53
3.3 Tercera etapa	54
3.3.1 Inmunodetección (Western Blot)	54
3.3.2 Zimografía	54
3.4 Análisis estadístico	55
4. Aspectos éticos, normativos y de seguridad	56
5. Resultados	57
5.1 Docking molecular: TRI-SR y TRI-BE contra las proteínas FAK y Src ..	57
5.1.1 Docking molecular: TRI-SR vs FAK.....	57
5.1.2 Docking molecular: TRI-BE vs FAK.....	61
5.1.3 Docking molecular: TRI-SR vs Src	65
5.1.4 Docking molecular: TRI-BE vs Src	69
5.2 Ensayo de viabilidad celular (Ensayo de MTT)	75
5.3 Ensayo de migración celular (Ensayo de cierre de herida)	76
5.3.1 Ensayo de migración celular: TRI-SR.....	76
5.3.2 Ensayo de migración celular: TRI-BE.....	78
5.4 Ensayo de invasión celular (Ensayo en cámara de Boyden).....	79
5.4.1 Ensayo de invasión celular: TRI-SR.....	79
5.4.2 Ensayo de invasión celular: TRI-BE	81
5.5 Determinación de metaloproteinasas (MMP-9) por zimografía	83
5.5.1 Determinación de MMP-9: TRI-SR	83
5.5.2 Determinación de la MMP-9: TRI-BE	85
5.6 Determinación de la expresión proteica de las proteínas FAK y Src	86

5.6.1 Western blot p-FAK: TRI-SR	86
5.6.2 Western blot p-FAK: TRI-BE.....	87
5.6.3 Western blot p-Src: TRI-SR.....	89
5.6.4 Western blot p-Src: TRI-BE	90
5.7 Evaluación de la expresión proteica de E-cadherina y N-cadherina.....	91
5.7.1 Western blot E-cadherina: TRI-SR	91
5.7.2 Western blot E-cadherina: TRI-BE	93
5.7.3 Western blot N-cadherina: TRI-SR.....	94
5.7.4 Western blot N-cadherina: TRI-BE	95
6. Discusión.....	96
7. Conclusiones.....	104
Bibliografía	105
Anexos	117

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µM	Micromolar
ADF	Área de adhesión focal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Akt	Proteína cinasa B
AMACR	Alfametilacil-CoA racemasa
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Ca ²⁺	Ion de calcio
CaP	Cáncer de próstata
CIMO	2-(1-(4-(2-cianofenil)1-bencil-1H-indol-3-il)-5-(4-metoxi fenil)-1-oxa-3-azaspiro (5,5) undecano
CRPC	Cáncer de próstata resistente a la castración
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico Electrophoresis
FAK	Cinasa de adhesión focal
IC 50	Concentración inhibitoria máxima al 50%
IL-6	Interleucina 6

KRT14	Citoqueratina 14
KRT5	Citoqueratina 5
Log P	Coeficiente de reparto octanol-agua
MAPK	Mitógeno Activado Proteína cinasa
mCRPC	Metástasis óseas
MEC	Matriz extracelular
mL	Microlitro
mM	Milimolar
MMP-9	Metaloproteinasa-9
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate-buffered saline
PDB	Protein Data Bank
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PIP2	Fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato
PSA	Antígeno prostático específico
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel

SFB	Suero fetal bovino
TDA	Terapia de privación de andrógenos
TEM	Transición epitelio mesénquima
TNM	Tumor Nodo Metástasis
Tris-HCl	Clorhidrato de Tris
uma	Unidad de masa atómica
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

LISTADO DE TABLAS

TABLAS

Tabla 1. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína FAK.....	57
Tabla 2. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-BE y la proteína FAK.....	61
Tabla 3. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína Src.	65
Tabla 4. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-BE y la proteína Src	69

LISTADO DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. La molécula 8-bencil-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano inhibe la migración de células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231.....	22
Figura 2. Representación histológica del tejido prostático.....	31
Figura 3. Tipos de uniones celulares en tejido epitelial.	42
Figura 4. Evolución del proceso de transición epitelio mesénquima (TEM).....	43
Figura 5. Esquema de la metodología utilizada en el proyecto de investigación.....	50
Figura 6. Docking molecular 1 del TRI-SR y la proteína FAK.....	58
Figura 7. Docking molecular 2 del TRI-SR y la proteína FAK.....	59
Figura 8. Docking molecular 3 del TRI-SR y la proteína FAK.....	60
Figura 9. Docking molecular 1 del TRI-BE y la proteína FAK.....	62
Figura 10. Docking molecular 2 del TRI-BE y la proteína FAK.....	63
Figura 11. Docking molecular 3 del TRI-BE y la proteína FAK.....	64
Figura 12. Docking molecular 1 del TRI-SR y la proteína Src	66
Figura 13. Docking molecular 2 del TRI-SR y la proteína Src	67
Figura 14. Docking molecular 3 del TRI-SR y la proteína Src	68
Figura 15. Docking molecular 1 del TRI-BE y la proteína Src.....	70
Figura 16. Docking molecular 2 del TRI-BE y la proteína Src.....	71
Figura 17. Docking molecular 3 del TRI-BE y la proteína Src.....	72
Figura 18. Interacciones teóricas entre las moléculas TRI-BE, TRI-SR y las proteínas FAK (A) y Src (B) evaluadas mediante docking molecular	74
Figura 19. Ensayo de viabilidad celular por MMT	75
Figura 20. Evaluación del TRI-SR en ensayo de migración celular.....	77
Figura 21. Evaluación del TRI-BE en ensayo de migración celular	78

Figura 22. Evaluación del TRI-SR en ensayo de invasión celular	80
Figura 23. Evaluación del TRI-SBE en ensayo de invasión celular	82
Figura 24. Impacto del TRI-SR sobre la secreción de MMP-9	84
Figura 25. Impacto del TRI-BE sobre la secreción de MMP-9.....	85
Figura 26. Efecto del TRI-SR sobre los niveles de p-FAK.....	87
Figura 27. Efecto del TRI-BE sobre los niveles de p-FAK.....	88
Figura 28. Efecto del TRI-SR sobre los niveles de p-Src	89
Figura 29. Efecto del TRI-BE sobre los niveles de p-Src.....	90
Figura 30. Repercusión del TRI-SR sobre los niveles de E-cadherina.....	92
Figura 31. Repercusión del TRI-BE sobre los niveles de E-cadherina.....	93
Figura 32. Repercusión del TRI-SR sobre los niveles de N-cadherina.....	94
Figura 33. Repercusión del TRI-BE sobre los niveles de N-cadherina.....	95
Figura 34. Vía de señalización FAK/Src.....	103

RESUMEN

Introducción: En la actualidad el cáncer es una problemática de suma importancia, debido a lo complejo de establecer un tratamiento efectivo. En el año 2020, acorde al reporte de Globocan, se registraron 19,292,789 casos nuevos y 9,958,133 defunciones a causa de esta enfermedad. El cáncer es considerado en la actualidad como una enfermedad heterogénea, sumamente variable debido al cambio constante de sus componentes moleculares. Es importante dilucidar los principios sobre los cuales se desarrolla la progresión tumoral/carcinogénesis, caracterizada por un incremento en la proliferación, inducción de angiogénesis, así como la generación de la invasión y metástasis. **Objetivo:** El presente trabajo tiene la finalidad de Evaluar la actividad de dos triazaspiranos como inhibidores de los procesos de migración e invasión en células epiteliales tumorales prostáticas PC3, a través de una posible regulación negativa de la vía de transducción de señales FAK/Src, y una disminución en la secreción de metaloproteinasa 9 (MMP-9). **Metodología:** Se realizó un análisis de docking molecular por medio del programa Moe 2008.10. Usando a los triazaspiranos 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-SR) y 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-BE) contra las proteínas FAK y Src. Se llevaron a cabo ensayos de migración (ensayo de cierre de herida o “scratch”) e invasión (ensayo en cámara de Boyden) en células epiteliales tumorales prostáticas PC3 estimuladas con los triazaspiranos. Además, se empleó la técnica de Western Blot para la cuantificación de la expresión proteica en las proteínas p-Fak, p-Src, E-Cadherina y N-Cadherina además de la técnica de zimografía para observar la secreción de la MMP-9. **Resultados:** El docking molecular mostró interacciones en regiones de interés de las proteínas FAK y Src, en los ensayos de actividad biológica se demostró un efecto inhibitorio en la migración e invasión celular, además de una importante supresión de la secreción de metaloproteinasas, por otra parte, se vio una disminución en la expresión de las proteínas p-FAK y p-Src en las células PC3 tratadas con los compuestos evaluados. **Conclusiones:** Las moléculas de tipo triazaspirano tienen efectos inhibitorios importantes sobre los mecanismos asociados a la metástasis en células tumorales prostáticas PC3.

ABSTRACT

Introduction: Currently, cancer is a problem of great importance due to the complexity of establishing an effective treatment. According to the 2020 Globocan report, 19,292,789 new cases diagnosed and 9,958,133 deaths from this disease were registered. Cancer is considered as a heterogeneous disease, highly variable due to the constant changes of its molecular components. It is important to elucidate the principles on which tumor progression/carcinogenesis develops, characterized by an increase in proliferation, induction of angiogenesis, as well as invasion generation and metastasis. **Objective:** The purpose of this work is to evaluate the activity of two triazaspirans as inhibitors of migration and invasion processes in tumor PC3 prostatic epithelial cells, through a possible negative regulation of the FAK/Src signal transduction pathway, and a decrease in the secretion of metalloproteinase 9 (MMP-9). **Methodology:** A molecular docking analysis was performed using the Moe 2008.10 program. Using the triazaspiranes 1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (TRI-SR) and 8-Benzyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (TRI-BE) against FAK and Src proteins. Migration assays (wound closure assay or "scratch") and invasion (Boyden chamber assay) were carried out in tumor PC3 prostatic epithelial cells stimulated with triazaspirans. In addition, Western Blot technique was used to quantify protein expression in p-Fak, p-Src, E-Cadherin and N-Cadherin proteins, besides the zymography technique to observe the secretion of MMP-9. **Results:** The molecular docking showed interactions in regions of interest of the FAK and Src proteins, in the biological activity assays an inhibitory effect on cell migration and invasion was demonstrated, also an important suppression of the secretion of metalloproteinases, on the other hand, a decrease in the expression of p-FAK and p-Src proteins was seen in PC3 cells treated with the evaluated compounds. **Conclusions:** Triazaspiran-type molecules have important inhibitory effects on the mechanisms associated with metastasis in tumor PC3 prostate cells.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer es una problemática de suma importancia, debido a lo complejo de establecer un tratamiento efectivo. En el año 2020, acorde al reporte de Globocan, se registraron 19,292,789 casos nuevos y 9,958,133 defunciones a causa de esta enfermedad (1).

El cáncer es considerado en la actualidad como una enfermedad heterogénea, sumamente variable debido al cambio constante de sus componentes moleculares. Es importante dilucidar los principios sobre los cuales se desarrolla la progresión tumoral/carcinogénesis, caracterizada por un incremento en la proliferación, evasión sobre los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, generación de células inmortalizadas, inducción de angiogénesis, así como la generación de la invasión y metástasis. No obstante, según Hanahan y Weinberg, se han agregado dos nuevos conceptos a estos eventos precedentes en las células cancerosas, los cuales son el desarrollo de un proceso inflamatorio y la inestabilidad genética y mutaciones (2). Siendo una patología a nivel celular, y concordando con lo previamente mencionado, las células afectadas se encuentran alteradas debido a mutaciones genéticas y cambio epigenéticos, lo que da como resultado una importante inestabilidad genética (3). Las distintas modificaciones que se generan en el ácido desoxirribonucleico (ADN) a través del tiempo, se asocian con un estado multifactorial, siendo determinantes en el desarrollo de aberraciones genéticas que propician el desarrollo del cáncer (4). Así mismo, el fenómeno de inflamación crónica es un proceso que está asociado íntimamente con el desarrollo de esta patología, donde parte de un reclutamiento de leucocitos y producción de citocinas y quimiocinas propician un microambiente idóneo para la progresión tumoral; por otro lado, deriva en la generación de angiogénesis y formación de la transición epitelio-mesénquima (TEM), otorgando la capacidad de migrar e invadir y posterior a ello metástasis (5).

Ahora bien, uno de los cánceres más diagnosticados en el género masculino es el cáncer de próstata (CaP), definido como aquella condición donde hay desarrollo de células cancerosas en la glándula prostática (6).

La complejidad de la evolución del cáncer ha llevado a implementar la clasificación de la enfermedad de acuerdo con patrones de estadificación, esto con el fin de evaluar su evolución, examinando su grado de extensión y propagación, así como la efectividad de los tratamientos. El sistema Tumor, Nódulos linfáticos, Metástasis (TNM) es el que se encuentra aceptado mundialmente para la clasificación de la enfermedad, pudiendo variar según el tipo de cáncer (7). Dicho sistema es considerado estándar de oro y punto de referencia para el pronóstico. La octava edición del sistema del American Joint Committee on Cancer (8th AJCC) incorpora variables clínicas y patológicas que ayudan a diagnosticar con mayor precisión el cáncer de próstata (8). Otro de los métodos empleados, que sumado al diagnóstico de TNM ayuda para la terminación patológica del CaP, es mediante la escala de Gleason, la cual es determinante para la evaluación del tejido prostático, arrojando un pronóstico importante sobre el estado del paciente evaluado, permitiendo inferir la necesidad de tratamientos acorde con el grado de desarrollo de la carcinogénesis (9). Por lo tanto, es importante la detección temprana del CaP debido a que implica una disminución de casos de metástasis y por ello también una disminución en la mortalidad, dando el tiempo para que la enfermedad en dichas etapas pueda ser tratada con mejores herramientas (10).

La metástasis es un término empleado para describir la capacidad que las células cancerosas poseen de migrar e invadir tejidos cercanos hasta alcanzar su diseminación en órganos distantes. Se ha determinado como la mayor causa de muerte en cáncer estimando que alrededor del 90% de la mortalidad es derivada de dicho fenómeno (11). Algunas de las formas de tratar el CaP son la vigilancia local, radioterapia local o la prostatectomía radical, la decisión del tratamiento en cuestión se basa en el estado clínico y los niveles de antígeno prostático específico (PSA). Cuando la enfermedad se encuentra en etapas avanzadas donde ya ha invadido otros tejidos, la terapia de privación de andrógenos por medio de castración quirúrgica o química se convierte en una opción, no obstante, las recaídas podrían ocurrir en un lapso de 18 a 36 meses, lo que evidencia resistencia al tratamiento (12). Algunas de las complicaciones que se presentan durante el tratamiento del cáncer de próstata son el desarrollo de disfunción urinaria, sexual o intestinal,

trayendo consigo una pobre mejora en la calidad de vida del paciente (13). Por lo ya mencionado, es necesario buscar alternativas farmacológicas que provean una mejora en los pacientes con CaP. En este sentido, algunos estudios denotan la incursión de nuevas estrategias para la mejora en la calidad de vida del paciente con CaP. Uno de estos enfoques es el de Sulaiman et al.(14), quienes demostraron la actividad de la molécula de 2-(1-(4-(2-cianofenil)1-bencil-1H-indol-3-il)-5-(4-metoxi-fenil)-1-oxa-3-azaspiro (5,5) undecano (CIMO) en células de cáncer de mama, donde encontraron una supresión de la formación de colonias y viabilidad celular de las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7, y donde dicha molécula actúa inhibiendo la sobre activación de la vía STAT3, la cual está fuertemente relacionada con la progresión de distintos tipos de tumores. Reforzando lo anteriormente citado, también se ha reportado la asociación de STAT3 con el crecimiento de células cancerosas, particularmente carcinoma hepatocelular, linfoma y mieloma múltiple. El N'N-dietil-8,8-dipropil-2-azaspiro[4,5]decano-2-propanamina (atiprimod) fue probado en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-468, donde el tiempo de exposición al fármaco mostró inhibición de la viabilidad celular y la formación de colonias en células de cáncer de mama (15).

El presente trabajo, tiene como objetivo, evaluar a las moléculas de tipo triazaspirano 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-SR) y 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-BE), con un posible efecto anti-metastásico en células de cáncer de próstata.

1.1 Antecedentes

Las moléculas de tipo azaspirano, son compuestos que han sido asociados con diversos efectos benéficos, tal es el caso de su actividad inmunorreguladora, donde se ha reportado este efecto en modelos *in vivo* a través del control de la respuesta inflamatoria, observándose beneficios importantes en modelos murinos con artritis reumatoide, dejando establecido que propicia una acción antiinflamatoria y una mejora en la preservación de la integridad ósea (16,17).

Actualmente existe poca documentación sobre la capacidad anti-cancerígena de dichas moléculas, no obstante, hay algunas investigaciones que dejan un precedente interesante para continuar con la investigación de estos tipos de compuestos.

El N´N-dietil-8,8-dipropil-2-azaspiro[4,5]decano-2-propanamina (Atiprimod) presenta propiedades anti-proliferativas y anti-angiogénica en células de mieloma mediante la activación de proteínas pro-apoptóticas como la caspasa-3 y -8, la inhibición de la fosforilación de Akt y STAT3, y una disminución en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e interleucina 6 (IL-6) (18,19); aunado a una disminución en los niveles de expresión proteica de JAK2 y fosfo-JAK2, regulando negativamente la vía JAK-STAT (20,21).

La vía JAK-STAT regula diversos procesos asociados a la progresión tumoral como proliferación, crecimiento, diferenciación, apoptosis, inflamación y transformación oncogénica, por lo que la desregulación de esta vía inhibe a diferentes niveles la progresión y desarrollo de célula tumorales. Adicionalmente, entre las moléculas blanco río abajo de la vía JAK-STAT se encuentran las de la vía PI3K-Akt, la cual se está implicada en la sobrevivencia y proliferación de diversos tipos celulares.

Asimismo, se ha demostrado el efecto anti-proliferativo de un derivado del tipo 1-oxa-3-azaspiro[5.5]undecano a través de la modulación de la vía JAK2/STAT3 en células de carcinoma hepatocelular y células de cáncer de mama tanto positivas como negativas a receptores estrogénicos (14,22).

Por otro lado, se ha trabajado en la síntesis y evaluación de una serie de compuestos del tipo 1,4-dioxa-8-azaspiro [4.5] decano, encontrando que presentan efectos como potenciales trazadores para células tumorales, ya que se demostró una alta acumulación de estos compuestos en carcinoma y melanoma de origen humano, lo que evidencia que este tipo de compuestos penetran con facilidad en la célula tumoral, aunque no se evaluó sus propiedades antiproliferativas (23).

En el Laboratorio de Enfermedades Metabólicas y Cáncer de la Facultad de Medicina Mexicali, se han realizado experimentos (no publicados) para evaluar el efecto de concentraciones crecientes del 8-bencil-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano sobre la migración de células de la línea cancerosa mamaria MDA-MB-231 mediante el ensayo de cierre de herida (scratch wound assay). Los resultados demuestran que este compuesto induce una disminución en la capacidad migratoria de las células MDA-MB-231 dependiente de la concentración, observándose un máximo de inhibición de la migración a una concentración 5 mM del compuesto antes mencionado (Figura 1).

Por otro lado, y en relación con compuestos de tipo triazaspiranos, Ma et al. (24) evaluaron la actividad anti-proliferativa de compuestos del tipo 6,8,10-triazaspiro[4.5]deca-6,8-dienos y 1,3,5-triazaspiro[5.5]undeca-1,3-dienos contra células cancerosas de pulmón A549. Particularmente se reportó una IC₅₀ de 27.1 nM para el compuesto 7,9-diamino-10-(3'-(4"-chloro-phenoxy)-propyloxy)-6,8,10-triaza-spiro[4.5]deca-6,8-dieno. Por su parte Fleita et al. (25), diseñaron, sintetizaron y evaluaron la actividad biológica de una serie de derivados de tipo triazaspiro[4.5]dec-8-eno. Entre los compuestos estudiados, se encontró que el 9-amino-2-(4-methoxybenzylidene)-3,7-dioxo-4-phenyl-1-thia-4,6,8-

triazaspiro[4.5]dec-8-ene-10-carbonitrilo, así como el 9-amino-2-(4-methylbenzylidene)-3-oxo-4-phenyl-7-thioxo-1-thia-4,6,8-triazaspiro[4.5]dec-8-ene-10-carbonitrilo, mostraron la actividad anti-proliferativa más potente contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), con un IC₅₀ de 10.8 μ M.

Por lo anterior, es importante realizar futuras investigaciones sobre la potencial actividad anti-cancerosa de compuestos de tipo triazaspiranos, a través de estudios de tipo dosis/respuesta y actividad biológica en distintos modelos de investigación en cáncer.

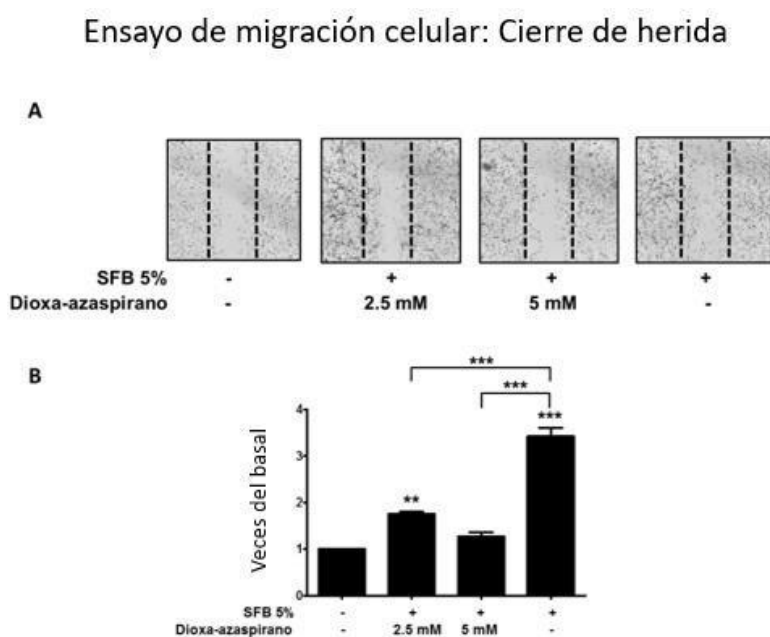


Figura 1. La molécula 8-bencil-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano inhibe la migración de células tumorales mamarias invasivas MDA-MB-231. Panel A. Células MDA-MB-231 fueron cultivadas en cajas de 35 mm y pre-tratadas con 12 μ M de mitomicina C por 2 horas. Posteriormente, se realizó una rayadura con puntas de plástico para pipeta de 200 μ L y los cultivos fueron estimulados durante 24 horas con o sin el compuesto 8-bencil-1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decano a diferentes concentraciones. Las fotografías fueron tomadas 24 horas después del estímulo con este compuesto. Panel B. Las gráficas representan la media $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes y son expresados como las veces de migración con respecto al control (células MDA-MB-231 en ausencia de suero fetal bovino, SFB). Los asteriscos denotan significancia estadística. **P<0.05, ***P<0.001 mediante ANOVA de una vía.

1.2 Planteamiento del problema

El cáncer es una de las enfermedades con mayor morbi-mortalidad en el mundo. De acuerdo con Globocan, en el año 2020 se registraron 19,292,789 casos nuevos y 9,958,133 defunciones a causa de la enfermedad en el mundo. El cáncer prostático ocupó el cuarto lugar de nuevos casos en el año 2020, con un 7.3% (1,414,259 de casos reportados). En cuanto a las muertes de hombres por cáncer, el cáncer prostático se ubicó en la quinta posición con un 6.8% (375,304 defunciones). Acorde con los datos obtenidos en 2020, en México, el cáncer de próstata es el segundo con más incidencia 13.7% (26,742 casos), solo por debajo del cáncer de mama; y en varones mexicanos, es el número uno con el 29.9% (26,742 casos). En los próximos 5 años se estima que el cáncer de próstata ocupará el segundo lugar en prevalencia en la población mexicana (90,670) (1). En Sudamérica y América Central se tiene una proyección para el año de 2030 de 249,000 casos y 86,000 defunciones, derivado del envejecimiento de la población y los distintos factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad (26).

Una de las principales problemáticas que está relacionada con los tratamientos del paciente con cáncer de próstata avanzado es la resistencia terapéutica a la deprivación de andrógenos y quimioterapia, esta se realiza a través de la castración quirúrgica. Sin embargo, a pesar de llevarlo a cabo, la enfermedad invariablemente progresará a cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Aproximadamente el 90% de los pacientes con CRPC desarrollan metástasis óseas (mCRPC), lo que puede explicar una morbilidad y mortalidad significativas asociadas con la enfermedad (27,28). Se conoce que el microambiente tumoral está asociado con el desarrollo de algunas vías de señalización que promueven características propias de la célula tumoral maligna, tal es el caso de la supervivencia celular o la invasión, todo esto en relación con la resistencia que presentan a la anoikis, este mecanismo es conocido como una resistencia a la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula-matriz son inapropiadas.

Ante esta situación es indispensable dilucidar y entender no solo las vías de señalización derivadas del receptor de andrógenos, si no el resto de los mecanismos asociados al desarrollo del fenómeno de la resistencia, por lo que estudiar nuevos blancos terapéuticos aportaría una gran ayuda en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Por todo esto, la generación de nuevos compuestos con propiedades antitumorales (con leves o nulo efecto adverso) es de suma importancia, su implementación traería consigo una mejora en la calidad de vida de los pacientes.

Basándonos en lo previamente reportado sobre las moléculas de tipo azaspirano, los cuales comparten una estructura de tipo azaspiro [4.5] y [5.5] y sus efectos sobre las células cancerígenas, se propone evaluar dos compuestos de tipo triazaspiranos [4.5], con potencial actividad antitumoral, con la ventaja de que éstos son de fácil obtención y con buen rendimiento, además del bajo costo que representa su síntesis. Actualmente no hay reportes en la literatura en relación con el estudio del posible efecto inhibitorio de moléculas del tipo triazaspirano sobre la migración e invasión de células tumorales prostáticas.

1.3 Justificación

Es importante generar mayor conocimiento sobre diversos compuestos y su potencial utilidad como tratamientos contra el cáncer, particularmente tomamos la iniciativa para probar una serie de compuestos de la familia de los triazaspiranos en un modelo de cáncer prostático *in vitro*, de lo cual no existen reportes previos sobre su efecto inhibitorio de los mecanismos de progresión tumoral, siendo la migración e invasión los principales factores de interés, identificando el mecanismo de señalización celular para la determinación de un posible efecto anti-tumoral presente en las células tumorales prostáticas.

Por otra parte, el desarrollo de esta investigación permitirá un crecimiento en el área de investigación asociada al estudio del cáncer, siendo pilar para la generación de nuevos proyectos en el área de la investigación biomédica de frontera con un modelo multidisciplinario en la región del Noroeste de México, propiciando la formación de profesionistas altamente capacitados y con conocimiento de impacto en la fisiopatología molecular del cáncer y la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos y moléculas antitumorales.

1.4 Hipótesis

Al menos uno de los triazaspiranos que se propone evaluar disminuirá significativamente la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas prostáticas PC3, a través de la inhibición de las vías de transducción de señales FAK/Src, y de una disminución en la secreción de MMP-9.

1.5 Objetivos de investigación

1.5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad de dos triazaspiranos como inhibidores de los procesos de migración e invasión en células epiteliales tumorales prostáticas PC3, a través de una posible regulación negativa de la vía de transducción de señales FAK/Src, y una disminución en la secreción de MMP-9.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar los cultivos de células tumorales prostáticas PC3.
2. Realizar docking molecular contra ligandos de interés asociados a la vía de señalización FAK/src, de los triazaspiranos 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-SR) y 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona (TRI-BE).
3. Determinar la viabilidad celular de los cultivos de las células PC3 tratados mediante el ensayo de MTT.
4. Evaluar la capacidad de inhibición de los dos triazaspiranos TRI-SR y TRI-BE sobre el mecanismo de migración de células tumorales prostáticas.
5. Valorar el efecto inhibitorio de los dos triazaspiranos sobre el mecanismo de invasión celular en las células tumorales prostáticas.

6. Evaluar si el tratamiento de las células tumorales de próstata con los dos triazaspiranos promueve una disminución en la secreción de MMP-9.
7. Determinar si la estimulación con los dos triazaspiranos seleccionados regula la fosforilación de FAK (tirosinas 397/577) y Src (tirosina 418), así como la formación de contactos focales y fibras de estrés en células cancerosas prostáticas.
8. Analizar si el uso de las moléculas de tipo triazaspiranos regulan la expresión de la E-cadherina y N-cadherina para asociar así el fenómeno de “switch de cadherinas” en células cancerosas prostáticas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer

2.1.1 Definición y características

La palabra cáncer es utilizada para denominar un grupo de enfermedades que puede afectar a casi cualquier tejido corporal, caracterizada por una reproducción celular anormalmente veloz y descontrolada, que se disemina fuera de sus límites normales y llega a invadir tejido adyacente o incluso a otras partes del cuerpo (29).

Definida como una enfermedad genética, causada por un malfuncionamiento de los genes que controlan la formación y multiplicación celular. Estos errores genéticos pueden ocurrir cuando se multiplican, daños del material genético por cuestiones ambientales y sustancias químicas, así como herencia de padres a hijos (30).

Existen en la actualidad 8 características que nos permiten definir el accionar asociado al cáncer, incremento en la señalización proliferativa, la evasión de los supresores del crecimiento, la presencia de la inmortalidad replicativa, la inducción del angiogénesis, resistencia a la muerte celular, activación de la invasión y metástasis, así mismo aparecen dos nuevos conceptos que se han integrado reprogramación del metabolismo celular y evasión del ataque inmunitario (31).

2.1.2 Epidemiología

El cáncer es uno de los problemas de salud más importantes en todo el mundo. Según los datos obtenidos por Globocan 2018 se estimaron un total de 18.1 millones de diagnósticos nuevos de cáncer y 9.6 millones de casos de mortalidad a nivel mundial (32). En población pediátrica se detectan 400,000 casos de cáncer anualmente, los cuales varían en tipo según el país de procedencia. En población adulta los tipos de cáncer más frecuentes en el mundo son cáncer de mama, pulmón, colorrectal, prostático, piel y gástrico, en orden de frecuencia diagnóstica respectivamente. Durante el año 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró un aproximado de casi 10 millones de muertes oncológicas a nivel internacional (1).

2.1.3 Fisiopatología de cáncer

El organismo es un sistema biológico complejo, con distintos compuestos que interaccionan con células y estroma de soporte. El cáncer es de la misma manera una enfermedad compleja con interacciones a distintos niveles tanto celular, tisular y orgánica (33). Podemos describir que el cáncer tiene una pérdida de la homeóstasis, originado a consecuencia de un cúmulo de mutaciones genéticas de las señales de proliferación y muerte celular, sumando su capacidad para evitar la corrección mutágena, da lugar a células tumorales transformadas (34).

Las mutaciones crean cambios en la lectura del material genético, provocando pérdida o ganancia de la función celular. En estudios relacionados con el cáncer se han dividido las mutaciones de biología celular tumoral en dos categorías según la función que realizan: mutaciones conductoras y pasajeras; siendo las mutaciones pasajeras aquellas que generan ventajas adaptativas, estas mutaciones no precisan la aparición de cáncer; suceden aleatoriamente sobre células cancerígenas y normales, sin generar selectividad sobre el crecimiento, se les puede denominar mutaciones pre neoplásicas. Por otra parte, se encuentran las mutaciones conductoras las cuales son necesarias para la tumorigénesis, ya que suceden en genes críticos que promueven ventajas selectivamente hacia la célula tumoral (35).

Los cambios genéticos dan como resultado células cancerígenas que contienen alta resistencia a la apoptosis además de la capacidad de invadir de forma local y distante lo cual ha sido relacionado con alteraciones genéticas asociadas a la acción de distintas vías de señalización celular (36).

Por otro lado, la desregularización genética permite la nutrición de tumor por angiogénesis causada por invasión de vasos sanguíneos que puede llegar a invadir otros tejidos generando diseminación. Así mismo un pobre microambiente tumoral también es un factor importante a tener en consideración, por tal situación las células cancerígenas expresan varios genes, se incrementa la biosíntesis de proteínas, permitiendo que el potencial de supervivencia y diseminación metastásica incremente (37).

2.2 Cáncer de próstata

2.2.1 Definición

Es una neoplasia hormono dependiente considerada como uno de los principales problemas de salud anualmente a nivel mundial. Es originado cuando las células del tejido prostático se reproducen de manera descontrolada (38).

2.2.2 Anatomía

La próstata es una glándula de tejido fibromuscular perteneciente al aparato reproductor masculino con forma de pirámide invertida, localizado debajo de la vejiga y delante del recto, rodeando el primer tramo de la uretra. Su tamaño suele variar según la edad, aunque suele relacionarse con el tamaño de una nuez en población joven sana; su función es la generación de líquido que forma parte del semen. La anatomía prostática se divide en tres zonas: periférica, central y de transición, su irrigación es realizada por las arterias vesical inferior, pudenda interna y hemorroidal media (39). En la Figura 2 se observa la representación histológica del tejido prostático, compuesta por conductos y acinos localizados en el estroma, formado por distintos tipos de células como de musculo liso mayoritariamente y

también con la presencia de fibroblastos, así mismo el epitelio conformado por células de tipo luminal, basal, intermedio y neuroendocrina (40).

Más del 95% de los casos de cáncer prostático son de tipo adenocarcinoma y en aproximación del 5% restante, el 90% son carcinomas de células intersticiales, dejando el resto en carcinomas neuroendocrinos (de células pequeñas) o sarcoma (41).

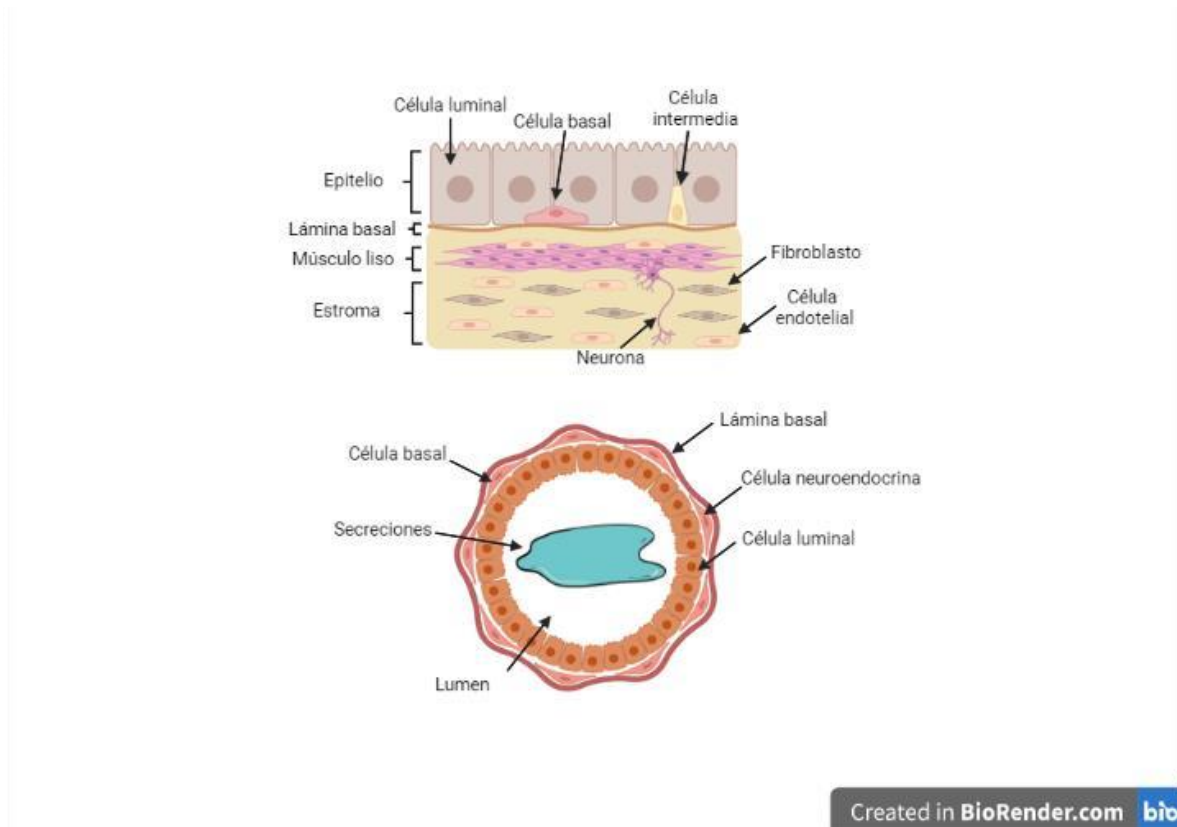


Figura 2. Representación histológica del tejido prostático.

2.2.3 Factores de riesgo del cáncer de próstata

Estos son los factores de riesgo asociados a cáncer de próstata:

1. Edad avanzada
2. Raza afroamericana
3. Antecedentes familiares de cáncer de próstata

La presencia de cáncer de próstata es considerada como poco frecuente en varones de 40 años o menores, siendo un incremento considerable a partir de los 55 años de edad (42).

Se han documentado importantes diferencias en las cifras de incidencia y mortalidad de cáncer de próstata en función de los grupos raciales y étnicos, siendo la raza negra la que presenta mayores tasas de incidencia (3 veces mayor) y mortalidad (2.4 veces mayor) esto reportado en Estados Unidos (43).

Se ha descrito que en hombres afroamericanos hay 200 casos por cada 100,000 hombres esto en comparación de hombres blancos donde se presentan 120 casos por cada 100,000 hombres, no obstante, en el rubro de la mortalidad las diferencias son considerablemente importantes entre poblaciones, ya que en la población afroamericana se reportan 44 muertes por cada 100,000 hombres mientras que en población blanca son 19 muertes y en población asiática e isleños del pacifico 9 defunciones esto por cada 100,000 varones respectivamente (44).

En el ámbito heredofamiliar, se ha encontrado que hombres con la enfermedad y tuvieron un padre o hermano que murió a causa de cáncer de próstata, tienen incrementado al doble el riesgo de morir por la enfermedad en comparación de aquellos que no tienen antecedentes familiares (42).

Se espera que para el año 2040 los casos de cáncer de próstata se eleven a un total de 2,3 millones de casos nuevos y 740,000 defunciones, esto por la exposición a factores de riesgo y envejecimiento de la población. Situaciones como las condiciones genéticas de los individuos (afrodescendientes mayor riesgo, población asiática menor riesgo) y la disponibilidad de atención médica (detección oportuna por disposición de pruebas diagnóstico) reflejan el flujo de casos y muertes por región (45).

2.2.4 Estadificación del cáncer de próstata

El cáncer de próstata localizado es considerado como asintomático, convirtiéndose en una problemática ya que cuando se presentan síntomas la enfermedad es demasiado avanzada, siendo uno de los síntomas más comunes la parálisis, derivada de una metástasis en la médula espinal. Por ello es necesario tener adecuadas estrategias para identificar a la enfermedad en una etapa considerada como curable (46).

La estadificación clínica es muy importante para evaluar el riesgo de la enfermedad de un paciente individual y, por lo tanto, también para las recomendaciones de tratamiento (47).

Los beneficios que nos aporta la estadificación están en función de los siguientes puntos:

- Categorización de la enfermedad
- Estimación del pronóstico
- Recomendación sobre el tratamiento más efectivo
- Manejo de la información sobre los pacientes en la atención médica y de investigación

2.2.4.1 Clasificación TNM

La TNM se utiliza en combinación con el grado del tumor y el PSA, considerada esta estrategia como bien aceptada para la toma de decisiones frente al tratamiento en el paciente con cáncer de próstata (48).

La clasificación TNM para el cáncer de próstata tiene las siguientes categorías: T= tumor, N =Nodos linfáticos y M= Metástasis.

Tumor

- TX: El tumor primario no se puede evaluar.
- TO: Sin evidencia de tumor primario.
- T1: Tumor clínicamente inaparente, no palpable y no visible por imagen.
- T1a: Tumor (no palpable) como hallazgo histológico incidental en la resección transuretral de próstata en el 5% del tejido resecado.
- T1b: Tumor (no palpable) como hallazgo histológico incidental en la resección transuretral de próstata en > 5% del tejido resecado.
- T1c: Tumor (no palpable) identificado por biopsia con aguja (para PSA sérico elevado): incluye tumor no palpable bilateral en biopsia con aguja.
- T2: Tumor confinado dentro de la próstata (incluido el vértice prostático, la cápsula de la próstata) que es palpable o visible en imágenes o (con el prefijo p) demostrado en una muestra de prostatectomía radical.
- T2a: Tumor que afecta la mitad de un lóbulo o menos.
- T2b: Tumor que afecta a más de la mitad de un lóbulo, pero no a ambos lóbulos.
- T2c: Tumor que afecta a ambos lóbulos.
- T3: El tumor se extiende a través de la cápsula prostática.
- T3a: Extensión extracapsular (ECE).
- T3b: Invasión de vesícula(s) seminal(es).
- T4: Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores y pared pélvica; ganglios linfáticos regionales, ganglios linfáticos pélvicos se definen como aquellos debajo de la bifurcación de las arterias ilíacas comunes (47).

Nodos linfáticos

- NX: No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
- N0: Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
- N1: Metástasis de ganglios linfáticos regionales dentro de la pelvis verdadera, debajo de la bifurcación de la arteria ilíaca común, ya sea unilateral o bilateral (47).

Metástasis

- MX: Las metástasis a distancia no se pueden evaluar.
- M0: Sin metástasis a distancia.
- M1a: Metástasis en ganglios linfáticos no regionales.
- M1b: Metástasis en hueso(s).
- M1c: Otro(s) sitio(s) de metástasis (47).

2.2.4.2 Sistema de puntuación de Gleason

El sistema de Gleason es una de las clasificaciones de puntuación más conocidas y aplicadas en la actualidad para identificar el estado del cáncer de próstata, dicho sistema de puntuación consiste en la evaluación de las características que presentan las células prostáticas, tomadas por medio de biopsia, donde se genera la comparación de la muestra con tejido sano para establecer diferencias y con ello el grado de daño presente en la muestra. Se identifica al grado 1 como aquellas células que se ven casi iguales a las células prostáticas normales, y el grado 5 como aquellas células que se identifican de una forma muy distinta a las células prostáticas normales. Se toman los dos grados más comunes de diferentes secciones para establecer el diagnóstico, los números más altos en la sumatoria se asocian a una etapa de mayor avance en la enfermedad (49).

Como previamente se ha descrito, hay distintas formas de estratificar el riesgo del cáncer de próstata, lo cual permite tomar decisiones para la elección del tratamiento más adecuado para el paciente.

En la actualidad el esquema más utilizado es el compuesto por diversos elementos, tanto el estadio clínico (TNM), PSA y la puntuación de Gleason siendo variables consideradas en el diagnóstico.

Los pacientes se identifican con bajo riesgo (estadio clínico T1-2a, PSA ≤ 10 ng/mL y puntaje de Gleason ≤ 6), riesgo intermedio (estadio T2b, PSA ≤ 20 ng/mL o puntaje de Gleason 7) y riesgo alto (estadio $\geq T2c$ o PSA ≥ 40 ng/mL o puntuación de Gleason ≥ 8) (50).

2.2.5 Tratamiento

Existen diversos factores de vital importancia para la elección del tratamiento de cáncer de próstata, estos están influenciados por la edad, condición de salud, efectos secundarios, nivel de antígeno prostático (PSA) y puntaje de Gleason entre otros. Se considera a la cirugía, radioterapia y terapia con rayos de protones como los tratamientos actuales para cáncer de próstata, donde en conjunto con la quimioterapia, terapia hormonal y criocirugía han permitido formular estrategias de tratamiento para la búsqueda de resultados favorables (51).

2.2.5.1 Cirugía

Considerada con uno de los elementos que forman parte de la estrategia de tratamiento en el cáncer de próstata, esta se requiere de manera importante cuando el carcinoma de próstata se ha diagnosticado de alto riesgo. La prostatectomía radical y la linfadenectomía pélvica son las intervenciones con mayor grado de aplicación en el cáncer de próstata (51).

2.2.5.2 Prostatectomía radical

Se define como la extirpación quirúrgica de la glándula prostática, vesículas seminales y tejido circundante (el adecuado para llegar a un valor quirúrgico negativo). Su objetivo consta de la extirpación completa del tejido canceroso (52).

De acuerdo a la Asociación Europea de Urología, el paciente con mayor probabilidad de beneficiarse con la intervención quirúrgica es aquel que tiene estos

puntos: puntuación de Gleason de biopsia ≤ 8 , el nivel sérico de PSA < 20 ng/ml y el tumor $\leq$ cT3a (51).

2.2.5.3 Radioterapia

Considerada como una de las estrategias terapéuticas de mayor uso en los cánceres de próstata localizados de alto riesgo, se considera la radioterapia de haz externo y la braquiterapia como tratamientos ampliamente utilizados, consideradas por su desarrollo tecnológico en los últimos años (51).

2.2.5.4 Terapia hormonal

Los andrógenos producidos en testículos, glándulas suprarrenales y próstata, son determinantes para el desarrollo y funcionamiento de la próstata, pero a su vez tiene injerencia directa sobre el desarrollo del cáncer prostático. Por lo antes mencionado, se ha creado una terapia de privación de androgrenos (TDA) usada para la prevención en la progresión del cáncer de próstata. Sin embargo, el efecto del tratamiento tiene una mediana de 18 meses, con el desarrollo asociado de cáncer de próstata resistente a castración. La castración trae consigo una serie de problemas secundarios como lo es la pérdida de libido, disminución de la masa ósea y muscular, riesgo de síndrome metabólico, además de enfermedad cardiovascular y muerte (52).

2.3 Cáncer y genética

El cáncer se ha descrito como una enfermedad genética, la inestabilidad en nuestros genes es un factor determinante en la tumorigénesis, tanto daños al DNA como deficiencias en la maquinaria de reparación son determinantes en esta problemática (53).

Protooncogenes y los genes supresores de tumores se ven alterados, adquiriendo mutaciones que les incapacita para poder realizar sus funciones de manera normal, siendo estos asociados a fenómenos como el desarrollo y diferenciación celular, así como la reparación y modificación del ADN (54). Existen una gran diversidad de

factores que tienen la capacidad de ser un peligro que atentan contra la integridad del genoma humano (55).

Resulta indispensable conocer que existen diversas causas que están asociadas al daño en el ADN, estos van desde factores externos como los exógenos, cuestiones como la luz ultravioleta, la radiación ionizante y distintos compuestos químicos de carácter genotóxico (humo de cigarro, pesticidas etc.), y por otra parte, los fenómenos endógenos, relacionados con subproductos del metabolismo, tal es el caso de las especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, radical hidroxilo y peroxinitrito) (53). Algunos de los mecanismos asociados a estas alteraciones exponen, roturas de cadenas, daños oxidativos o la formación de dímeros de pirimidinas (55). Aberraciones en genes como BRCA1, BRCA2 y p53 son algunos ejemplos de elementos mutados que dan un pronóstico orientado al desarrollo de algún tipo de cáncer (54).

Como previamente se ha descrito, existen diversas causas que se asocian al desarrollo del cáncer, particularmente hablando del cáncer de próstata, tenemos que ciertos microorganismos urinarios son causantes de impulsar la carcinogénesis urinaria, esto derivado del estrés oxidativo que generan a partir de las especies reactivas de oxígeno producidas, siendo estas moléculas causantes de daño en DNA, lo que implica generar mutaciones en ciertas células involucradas (56). En lesiones de neoplasia intraepitelial prostática se han encontrado que algunas pierden a ciertos marcadores basales como p63 (TP63), citoqueratina 5 (KRT5) y citoqueratina 14 (KRT14) o inclusive se encuentra la sobreexpresión de enzimas como la alfa metilacil-CoA racemasa (AMACR), está asociada al desarrollo del adenocarcinoma (56).

2.4 Vías de señalización en cáncer

Se conocen a las vías de señalización como una red molecular de comunicación celular, que tiene la importante función de fungir como una conexión entre los diferentes elementos que conforman a una célula, esta comunicación esta mediada por proteínas que forman parte de la activación o inhibición de procesos que ocurren

a nivel celular (crecimiento, proliferación o supervivencia celular), sea de manera directa o indirectamente (57,58).

De forma general una vía de señalización puede verse estimulada por diversos elementos (Factores de crecimiento, hormonas, citoquinas etc.) promoviendo la interacción con receptores (tirosina quinasa, asociados a proteínas G o relacionados a canales iónicos), lo que desencadena la transducción de señales por medio de intermediarios citosólicos y con ello generar la regulación de transcripción y transducción de genes (57).

Existen diversas vías que han sido identificadas como puntos importantes de estudio en cáncer ya que su funcionamiento se ve alterado de forma considerable, entre estas vías de señalización se encuentra la de MAPK, PI3K/Akt y FAK/Src (59). Estas vías de forma interesante se conectan entre sí, siendo factores que en conjunto permiten el desarrollo de los distintos elementos asociados a la fisiopatología que el cáncer genera, volviéndose un blanco idóneo para posibles tratamientos o terapias en favor mejorar la calidad de vida del paciente con cáncer (58).

2.4.1 Vía MAPK

Es considerada una de las vías más asociadas a distintos tipos de cáncer (pulmón, colon entre otros), donde diversos componentes que se encuentran relacionados con la vía, como lo es la proteína ERK, manifiestan interacciones en favor del desarrollo tumoral (60).

ERK siendo responsable de la fosforilación de diversas proteínas como FAK y paxilina, asociadas a la promoción de la migración celular (60). Por otro lado, también encontrando una asociación importante en la expresión de MMP'S, encargadas de la degradación de la matriz extracelular, propiciando la invasión de las células tumorales (61). Siendo estas algunas de sus implicaciones, la vía MAPK se convierte en un punto de atención para estrategias terapéuticas contra el desarrollo de la enfermedad.

2.4.2 Vía PI3K/Akt

Esta vía se ha visto descrita en una gran cantidad de fenómenos asociados al cáncer, tal es el caso de la proliferación y supervivencia celular, así como angiogénesis entre otros procesos relacionados a la progresión tumoral (62).

Su mecanismo de acción es conocido por estar implicado en la estimulación PI3K, esto a través de su subunidad reguladora o proteínas adaptadoras, generando una activación de PI3K y la conversión de lípidos de fosfatidilinositol-(3,4)-bisfosfato (PIP2) a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Por lo tanto, se promueve la interacción de PKB/Akt y PIP3, lo que deriva en la activación parcial de PKB/Akt (63). La activación de PKB/Akt activa a mTORC1, la cual tiene como sustratos una variedad importante de moléculas que promueven la síntesis y proliferación celular, por su parte Akt genera efectos de fosforilación (generando inhibición) sobre proteínas FOXO relacionadas con efectos proapoptóticos (64).

2.4.3 Vía FAK/Src

Esta vía está asociada al fenómeno de migración celular, este proceso mediado por la creación y desmontaje continuo de las interacciones célula-célula y célula con matriz extracelular (MEC), así mismo de una restructuración completa del citoesqueleto de actina. Para entendimiento del mecanismo descrito aparecen las integrinas (proteínas transmembranles), donde una de las funciones que presentan es la unión de la MEC con el citoesqueleto de actina intracelular, la generación de estas uniones de adhesión, son identificadas como áreas de adhesión focal (ADF), no obstante, no solo cumplen con un rol estructural, sino que también se ven implicados en fenómenos de señalización como lo es la proliferación, migración e invasión celular (65,66). En el fenómeno previamente descrito, fungen un rol esencial la quinasa de adhesión focal (FAK) y la cinasa Src (66).

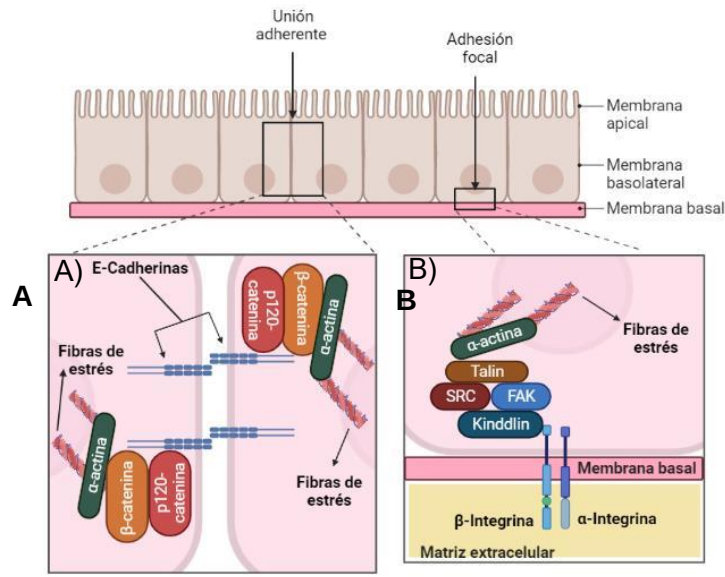
Se describe una interacción dada entre FAK y la proteína de tipo integrina, tras dicha reacción el residuo de tirosina 397 de FAK se autofosforila, dando punto de unión

para que Src pueda unirse y con ello generar un acoplamiento entre ambas proteínas. Seguido de la unión esto permite que Src fosforile múltiples lugares de la proteína FAK. Una vez formado el complejo e iniciado su máximo estado catalítico hay distintos sustratos tal es el caso de Grb2 entre otros, como se observa en la Figura 3, estas fosforilaciones conducen a la activación de diversas vías de señalización tal es el caso de la vía Ras-MAPK o la vía PI3K/Akt implicadas en fenómenos de angiogénesis, migración e invasión celular (67).

2.5 Adhesión celular

La estructura y migración celular es un proceso que está asociado a distintos eventos actuando de forma coordinada, influenciados por la tensión celular, determinada por dos componentes, como la fuerza de contracción del citoesqueleto y el fenómeno de anclaje que está relacionado con la resistencia a la contracción mediado por las interacciones célula-MEC y célula-célula (68).

Uno de los fenómenos más fuertemente asociados a la progresión del cáncer que desemboca en la metástasis, es la pérdida de las uniones célula-célula y célula-MEC (representadas en la Figura 3), ya que modulan de forma importante el fenotipo, proliferación, migración y supervivencia celular (69). Las uniones célula-célula se realizan en ciertas regiones de la membrana plasmática, llevadas a cabo por las proteínas cadherinas, siendo estas glicoproteínas dependientes de Ca^{2+} denominadas como moléculas de adhesión, principalmente actúan de forma homofílica generando uniones de cadherina con cadherina, siendo la cadherina E la más encontrada en células de carácter epitelial como se representa en la Figura 3 panel A (70).



Created in BioRender.com bio

Figura 3. Tipos de uniones celulares en tejido epitelial. Panel A) Unión adherente. Panel B) Adhesión focal.

Para la estabilidad de estructura celular, las cadherinas (dominio citoplasmático) interaccionan con la β -catenina, una vez formado el complejo, la α -catenina lo direcciona con los filamentos de actina del citoesqueleto adquiriendo con ello una estructura adecuada a nivel celular (70).

Para la célula tumoral es indispensable el cambio fenotípico y funcional para la supervivencia en el fenómeno metastásico, por ello es que ocurre el cambio denominado como transición epitelio mesénquimal (TEM) donde la célula es dotada una plasticidad para poder ejercer su mecanismo de invasividad y diseminación en distintas zonas del origen del tumor primario representado en la figura 4 (71).

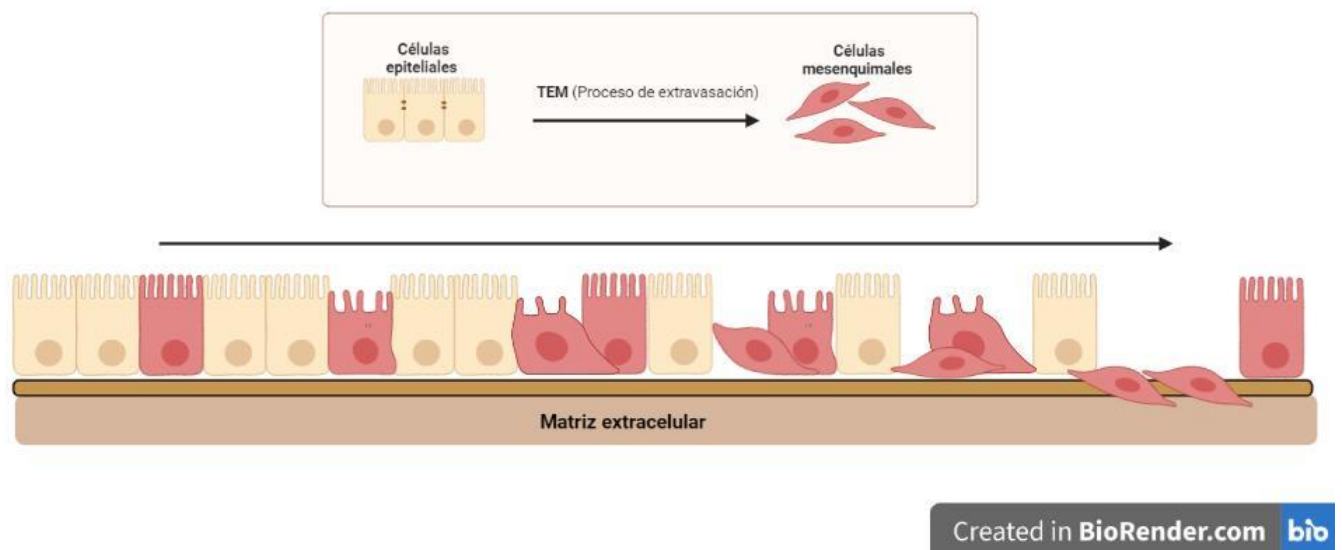


Figura 4. Evolución del proceso de transición epitelio mesénquima (TEM).

La TEM está considerada como elemento clave en la progresión tumoral hasta la metástasis, la adquisición de una estructura de tipo mesenquimatosa, proporciona rasgos característicos de las células tumorales, aquí aparece el fenómeno denominado como “switch de cadherinas” identificado como la pérdida de la expresión de E-cadherina y aumento de la expresión de N-cadherina. Lo que trae consigo que haya una pérdida de las interacciones que le dotan de estabilidad a la célula para mantener su estructura original, como pérdida de unión a la membrana basal (72). Además, N-cadherina también se relaciona con la activación la vía GTPasa de la familia Rho, generando modificaciones en el citoesqueleto y modulando otras vías de señalización como la de Wnt (73).

2.6 Migración celular

La migración celular es considerada como un evento indispensable para el correcto funcionamiento de un organismo, sin embargo, asociado a la problemática de cáncer se torna complejo, convirtiendo a este evento blanco para suprimir el desarrollo tumoral (74).

Cuando se habla de migración celular en el ámbito tumoral es importante hacer mención de la TEM, la cual como se ha mencionado está asociada a la plasticidad celular, aunado a la transformación de la célula cambiando sus características epiteliales (estado inmóvil) por un una de tipo mesenquimal (estado móvil) además de otros factores propios de las células tumorales como es la resistencia a la apoptosis o tratamiento. Algunos de los puntos cruciales en el desarrollo de este fenómeno viene dado por diversos factores de transcripción como lo son Twist, Snail, Slug y Zeb1 activados por vías como la de TGF- β y Wnt (75).

La migración celular viene dada por señales quimiotácticas que estimulan la extensión de protuberancias de la membrana celular, realizadas por la polimerización de actina, las células tumorales se desplazan sobre la MEC en tumores de carácter primario, estas protuberancias son conocidas como lamelipodios, donde se adhieren a fibras que contienen colágeno formando una adhesión dinámica, el movimiento en cuestión se da a través de la formación de adherencias entre la célula y su respectivo sustrato generando una tracción, finalmente el movimiento se genera al final derivado de la contracción de la célula separando la parte posterior de la célula del sustrato y moviendo el cuerpo de la célula hacia adelante (74,76). Elementos como PI3 y Akt/PKB activan GTPasas de la familia Rho (asociadas al control del ciclo celular, tráfico de vesículas, polaridad y organización de citoesqueleto), tales como Rac o Cdc42, siendo estas responsables de la polimerización y despolimeración de la actina en el frente de migración (74,77).

También juegan un papel importante el complejo de proteínas asociado a integrinas FAK y Src, estas implicadas en la regulación de las adhesiones focales

esquematisadas en la Figura 3 panel B, regulando las interacciones de las células con sus diferentes sustratos, promoviendo la migración celular (78).

2.7 Invasión celular y metástasis

La invasión en sus primeras etapas implica la activación de diversas vías que están asociadas al control del citoesqueleto, modificación en la MEC y las uniones célula-célula, aunado a la migración de las células tumorales (79).

Uno de los aspectos cruciales para la denominación del tumor como benigno o maligno está en función de la capacidad que tienen las células cancerígenas de degradar la membrana basal y lo que deriva a partir de ello (80).

Cuando célula tumoral adquiere propiedades migratorias e invasivas que le suscita la capacidad para poder salir a sistema linfático y vascular, logrando con ello ir a órganos distantes y establecer tumores secundarios, a esto se le conoce como metástasis, está causa del fracaso de los tratamientos y por ende responsable de aproximadamente el 90% de muertes por la enfermedad (80-82).

Diversos factores promueven el desarrollo tumoral, las células neoplásicas tienen la facultad de producir ciertas quimiocinas con la capacidad de atraer a células de sistema inmune, promoviendo con ello la angiogénesis y dejar características apropiadas para el desarrollo del nicho tumoral, no solo eso sino que también existe la remodelación de la MEC, donde se ven implicadas diversas moléculas como proteoglicanos, colágeno, lamininas, fibronectina, elastina y otras glicoproteínas cada una de ellas involucradas en los fenómenos invasivos y metastásico de la carcinogénesis (82).

Ante las variaciones de la MEC, se sabe que las MMP'S están implicadas, estas colagenasas están implicadas en la degradación de la membrana basal de las células siendo consideradas como un factor de mal pronóstico en el desarrollo tumoral (83). Hay una serie de sucesos que deben ocurrir para que la metástasis se lleve a cabo, iniciando por una secuencia de pasos que van siendo desarrollados

de la siguiente forma: Remodelación de la MEC, incremento de la angiogénesis, separación de las células del tumor sólido, la formación de invadopodios invadiendo tejido cercano, intravasación para dar entrada al sistema circulatorio o linfático, adherencia a células endoteliales de un sitio lejano del tumor en primera instancia, formando nuevamente invadopodios para dejar sistema circulatorio/linfático, con esto se le permite entrar en el nuevo tejido colonizando y generando proliferación para dar formación a un nuevo tumor (84,85).

Es importante mencionar que las células tumorales para el desarrollo metastásico no solo dependen de sus características propiamente, sino que también los microambientes a los que se exponen son condicionantes claves en la efectividad de colonización en el proceso metastásico, arquitectura tisular de la MEC, las interacciones entre las células tumorales, así como la implicación de las células endoteliales e inmunitarias están asociadas en dicho evento (86).

2.8 Regla de los 5 de Lipinski

En la búsqueda constante por las mejores elecciones de fármacos potenciales, se trabaja de forma ardua todo con el fin de encontrar resultados favorables para las personas, por ello se han desarrollado diversas estrategias de evaluación que permiten la mejor selección del compuesto candidato para las pruebas in vitro, todo esto en función de las propiedades químicas presentes en los compuestos formulados.

La regla de los 5 de Lipinski's consiste en una serie de puntos que son determinantes para indicar si un compuesto administrado por la vía oral en teoría presentara la solubilidad adecuada, así como la capacidad de difundirse a través de membranas biológicas (87), para cumplir con dicho principio no se deben violar más de uno de los siguientes puntos:

- Debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$) ≤ 5 .
- Debe poseer un peso molecular ≤ 500 uma.

- No debe contener más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno (átomos de nitrógeno u oxígeno con al menos un átomo de hidrógeno).
- No debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (87).

2.8 Docking molecular

Ante los diversos retos a los que nos enfrentamos en la actualidad en el área de la salud, surge la necesidad de generar nuevas estrategias terapéuticas. La elaboración de fármacos es considerada una problemática real aun en la actualidad por la complejidad que implica su elaboración y producción. Sin embargo, se ha optado por desarrollar nuevas estrategias para optimizar y encontrar nuevas moléculas con potencial efecto terapéutico, buscando obtener los mejores efectos biológicos en el organismo. Aparece una opción computacional conocida como acoplamiento molecular o docking molecular, diseñada para generar una predicción de las interacciones que ocurren entre ligandos y macromoléculas diana (87).

Este método *in silico* permite que ligandos de interés interaccionen con ciertas macromoléculas comúnmente proteínas (receptores) por medio de diseños 3D, donde permite identificar las regiones de interacción y grado de afinidad que hay entre ambos componentes (87,88).

Existe bastante evidencia en la actualidad que permite identificar al docking molecular como una herramienta de gran utilidad, un ejemplo de docking molecular empleado fue para identificar nuevos inhibidores no peptídicos de enzimas (proteasas de serina y cisteína) (88).

Es importante mencionar que el docking molecular, en primera instancia se creó para la evaluación de moléculas pequeñas y su interacción con proteínas, pero en la actualidad se han considerado también llevar a cabo docking sobre interacciones

proteína-proteína o ácido nucleico ADN o ácido ribonucleico (ARN) con algún ligando de interés (89).

De forma interesante se identifica que las conformaciones de unión de mayor afinidad entre ligando y receptor para establecer el nivel de afinidad vienen dados por dos puntos: 1) La generación de las distintas conformaciones (confórmers) de la molécula evaluada y su afinidad por diversas regiones de interacción con la proteína diana, por otro lado, 2) la determinación de la energía de interacción asociada con a las distintas interacciones formadas previamente (90).

2.9 Compuestos de tipo espiro-hidantoína

Hablando de la estructura de tipo hidantoína que forma parte de las moléculas propuestas a evaluación, se es conocido que son moléculas con efectos clínicamente aprobados como fenitoína, mefenitoína entre otros como fármacos anticonvulsivos, no obstante, se ha reconocido su versatilidad y ahora son implementadas en diversos ensayos clínicos probando que ejercen también efectos antitumorales, antiinflamatorios, antidiabéticos etc. (91).

Describiendo la estructura de las moléculas empleadas en la investigación, se conocen como compuestos espiro-heterocíclicos, han sido documentados con resultados favorables contra distintos tipos de cáncer, conocidos por ser estructuralmente hablando dos anillos unidos uno al otro, además de poseer elementos heterocíclicos, que les permite tener una buena interacción con las demás moléculas en un sistema biológico (92). En esencia la estructura de tipo spiro ha sido tomada en cuenta para la generación de nuevos fármacos antitumorales, algunos de estos compuestos probados en líneas celulares de cáncer mama, encontrando interesantes efectos citotóxicos (93).

Así mismo también formando parte de la estructura de estas moléculas estudiadas, tenemos a los grupos de tipo “aza”, denominándose así por la presencia de un anillo aromático con la estructura de heteroátomos que lo forman, en este caso átomos de nitrógeno en la estructura.

En la actualidad hay algunos compuestos derivados de las estructuras de tipo azaspirano, que son inhibidores de la acción de tirosinas quinasas, empleados en diversos ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer, algunos ejemplos de estos compuestos son atiprimod, lestaurtinib y K252a (14).

3. METODOLOGÍA

Se trata de un proyecto explicativo, experimental, cuantitativo, *in silico* e *in vitro*; en el que se utilizó la línea celular PC-3 adquirida del American Type Culture Collection (ATCC), EUA. El proyecto de investigación se dividió en tres etapas: La primera se fundamentó en la realización de un docking molecular de los dos compuestos a evaluar: TRI-SR y TRI-BE con acoplamiento a las proteínas de interés (FAK y Src) asociadas a la vía de señalización FAK/Src. La segunda etapa consistió en la estandarización del cultivo de células tumorales prostáticas PC3 y la evaluación de la actividad biológica de los triazaspiranos mencionados a través de ensayos de migración e invasión celular. La tercera etapa consistió del análisis de expresión de las proteínas p-FAK, p-Src, E-cadherina, N-cadherina y la segregación de la MMP-9. La Figura 5 resume la metodología del proyecto.

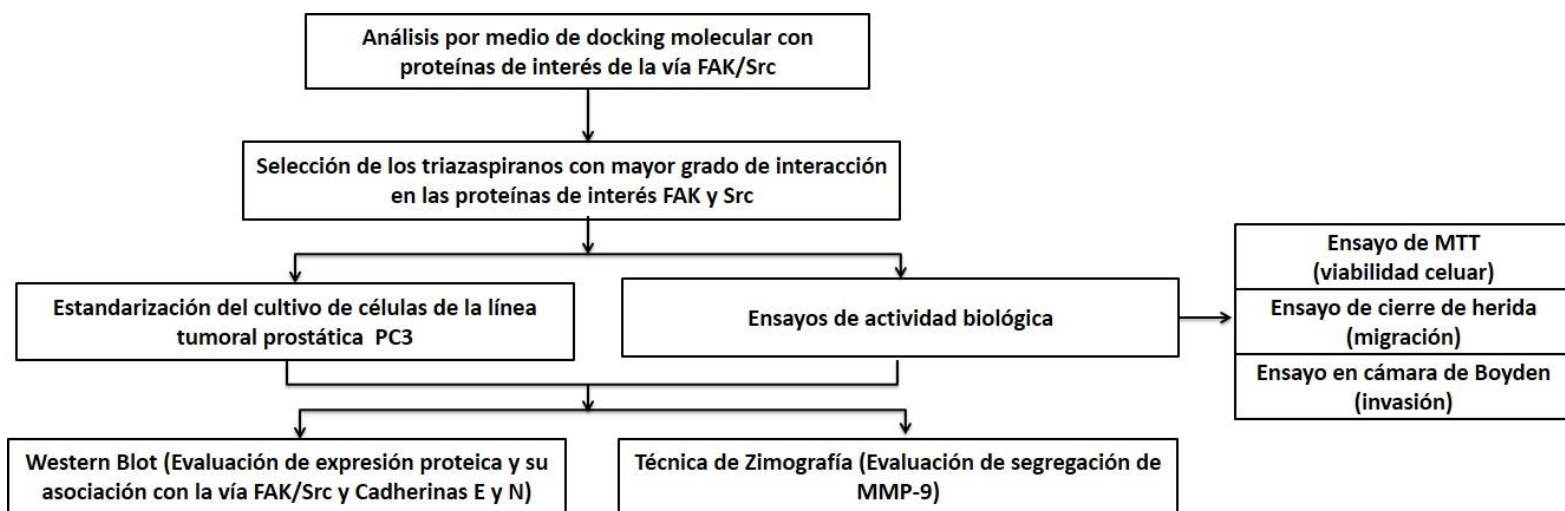


Figura 5. Esquema de la metodología utilizada en el proyecto de investigación.

3.1 Primera etapa

3.1.1 Docking molecular

El análisis de docking molecular fue realizado por medio del programa Moe 2008.10. El diseño de los ligandos TRI-SR y TRI-BE se realizó con el programa Corina, y las propiedades ADMET (Administración Distribución Metabolismo Excreción Toxicidad) de estos ligandos se evaluaron por medio del programa admetSAR. Posterior se obtuvieron las proteínas FAK y Src del Protein Data Bank (PDB): 1MP8 Crystal structure of Focal Adhesion Kinase (FAK) PDB DOI: 10.2210/pdb1MP8/pdb y 1FMK Crystal Structure of Human Tyrosine-Protein Kinase C-Src PDB DOI: 10.2210/pdb1FMK/pdb.

En el programa Moe 2008.10 se llevó a cabo la generación de los respectivos confórmeros de cada una de las moléculas a evaluar, posteriormente se procedió a trabajar con las proteínas de interés FAK y Src, las cuales, mediante el programa se procedió a prepararlas para el acoplamiento, eliminado moléculas de agua, protonado y seleccionando el campo de fuerza.

Se realizó el acoplamiento molecular de cada uno de los triazaspiranos mencionados con las proteínas FAK y Src, seleccionado los E-Score de mayor valor, y proceder a tomar los esquemas del sitio de interacción con los aminoácidos implicados, y la obtención de las representaciones tridimensionales de la interacción ligando-receptor.

3.1.2 Preparación de los compuestos (TRI-SR y TRI-BE)

Las moléculas TRI-SR y TRI-BE fueron sintetizadas en el Centro de Graduados e Investigación en el Instituto Tecnológico de Tijuana, Baja California, acorde a la metodología descrita por Rivero et al. (94). Los compuestos fueron obtenidos en estado puro, como paso adicional dentro de su preparación, la molécula TRI-BE fue diluida en un 20% (v/v) de solución de etanol (vehículo), ambos compuestos alcanzaron la concentración de 1 μ M (solución stock). Posteriormente, las soluciones stock se utilizaron para estimular los cultivos de células PC3 a las concentraciones indicadas en los experimentos.

3.2 Segunda etapa

La estandarización de la línea celular de cáncer prostático PC3 consistió en llevar a cabo el manejo de los cultivos en cajas de 100 mm de diámetro, con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 5% de SFB, antibióticos y en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno a 37°C.

En esta etapa además se realizaron los ensayos de viabilidad celular MTT, migración (ensayo de cierre de herida o “scratch”) e invasión (ensayo en cámara de Boyden) en células epiteliales tumorales prostáticas PC3.

3.2.1 Ensayo MTT

La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo MTT en diferentes condiciones durante 24 h. En primer lugar, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 150.000 células/pocillo y se dejaron crecer al 90 % de confluencia. A continuación, se reemplazó el medio de cultivo por un medio Opti-MEM. Después de 2 h de incubación, las células se trataron en distintas condiciones experimentales. Posteriormente se adicionó al medio de cultivo 30 µL de una solución madre de MTT 2.1 mg/mL para obtener una concentración final de 0.5 mg/mL. Los cristales de formazán formados después de 4 h de incubación se disolvieron mediante la adición del tampón de lisis (dodecilsulfato de sodio al 20 %, N, N-dimetilformamida al 50 %, pH 4,0), según la metodología de García et al. (95). Finalmente, la densidad óptica se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas.

3.2.2 Ensayo de migración de cierre de herida o “scratch”

Los triazaspiranos seleccionados fueron utilizados para estimular los cultivos de células PC3, y evaluar su capacidad inhibitoria sobre la migración celular mediante el ensayo de cierre de herida (también llamado “scratch”) como se ha reportado previamente (96). Cultivo celular PC3 con 100% de confluencia, fue sometido a supresión con DMEM sin suero durante 18 horas y fueron tratados con mitomicina

C durante 2 horas. Después de la supresión, se realizó la rayadura o “herida” utilizando la punta de una pipeta de 200 μ L estéril, posteriormente se lavaron los cultivos en una ocasión con PBS 1X para remover las células suspendidas. A continuación, las células PC3 fueron estimuladas durante 24 horas con cada uno de los triazaspiranos. Posterior a las 24 horas de estímulo, las células se fijaron con metanol frío y tiñeron con azul de coomassie, finalmente se lavó tres veces con phosphate-buffered saline (PBS) 1X. La migración celular dentro de la herida fue fotografiada usando un microscopio invertido con cámara acoplada.

3.2.3 Ensayo de invasión en cámara de Boyden

Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras de Boyden con filtros que presentan poros de 8 μ m de diámetro (96). Las células PC3 se sometieron a supresión de suero durante 18 horas. Se colocaron 15 μ L de Matrigel BD con 45 μ L de medio DMEM en los insertos de la parte superior de la cámara, se colocan en la incubadora 30 minutos hasta que el Matrigel BD y medio DMEM se solidifican. Posteriormente se realizó un pase celular colocando 100 μ L de células por condición sobre el Matrigel solidificado en la cámara de Boyden. En la parte inferior de la cámara se colocó un volumen final 600 μ L de medio DMEM, DMEM + SFB, así como DMEM + SFB más los triazaspiranos a evaluar de manera individual. Las células fueron incubadas en estas condiciones de tratamiento durante 24 horas a 37°C, tras lo cual se aspiró el medio de los compartimientos; las células se fijaron con metanol frío durante 10 minutos para posteriormente remover de la parte superior de la cámara a las células que no migraron, utilizando un hisopo de algodón. Tras realizar este procedimiento, las células presentes en la parte inferior fueron teñidas con azul de coomassie durante 10 minutos. Las membranas se lavaron 3 veces con agua bidestilada, la invasión celular fue determinada tras analizar la membrana de la cámara de Boyden y fue fotografiada usando un microscopio invertido acoplado a cámara.

3.3 Tercera etapa

En esta etapa se evaluaron los cultivos PC3 estimulados con los triazaspiranos señalados previamente, por medio de la técnica de Western Blot para la cuantificación de la expresión proteica de las proteínas p-Fak, p-Src, E-Cadherina y N-Cadherina, además de la técnica de zimografía para observar la secreción de la MMP-9.

3.3.1 Inmunodetección (Western Blot)

Los cultivos de células PC3 que fueron estimulados con los triazaspiranos, fueron lisados para la cuantificación de proteínas con el método de micro-bradford. Estos lisados fueron sometidos a una electroforesis por Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) al 10% para separar las proteínas, las cuales, una vez separadas, fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Posteriormente, las membranas de PVDF se bloquearon con leche al 5% durante 2 horas, después se colocó el anticuerpo primario diluido 1:500, incubando durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos que se utilizaron fueron los siguientes: anti-p-FAK-Tyr397, anti-p-Src-Tyr418, anti-E-Cadherina, anti-N-Cadherina, anti- β -actina. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con PBS-Tween al 0.1% y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario especie-específico peroxidado (dilución 1:5,000) durante 2 horas a 37°C en agitación, seguido de 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-Tween al 0.1%, y revelando mediante quimioluminiscencia. Las autorradiografías fueron escaneadas y las bandas cuantificadas usando el programa ImageJ 1.52a.

3.3.2 Zimografía

Cultivos confluentes de células PC3 fueron tratados con los correspondientes triazaspiranos (etanol y SFB serán utilizados como controles positivos de secreción de MMPs). Los medios condicionados se colectaron y fueron concentrados usando filtros centricon (Millipore) y centrifugados a 2,500 revoluciones por minuto (rpm) durante 2 horas. Volúmenes iguales de medio condicionado concentrado se

mezclaron con buffer de muestra (SDS 2.5%, sacarosa 1% y rojo de fenol 4 µg/mL) sin agentes reductores, y cargados en geles de acrilamida al 8% copolimerizados con gelatina a 1 mg/mL. Los geles se lavaron dos veces en Tritón X-100 al 2.5% e incubados en buffer de activación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7.4) a 37 °C durante 24 horas. Los geles se fijaron y tiñeron con Azul de Coomassie Brillante G-250 en ácido acético al 10% y metanol al 30%. La actividad proteolítica se detectó con la presencia de bandas claras contra el fondo teñido de sustrato no digerido. Los geles fueron escaneados y las bandas cuantificadas usando el programa ImageJ 1.52a.

3.4 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media $\pm$ la desviación estándar, donde fueron sometidos a una ANOVA de una vía, con una prueba de Dunnett. Para la búsqueda de diferencias entre grupos se utilizó un valor de significancia (α) de $P < 0.05$. Los datos se procesaron mediante el programa de datos GraphPad Prism Version 8.0.2 (97).

4. ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD

El presente estudio se desarrolló, hasta su conclusión, con apego a las disposiciones legales de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

5. RESULTADOS

5.1 Docking molecular: TRI-SR y TRI-BE contra las proteínas FAK y Src

En el presente trabajo se planteó evaluar diversos fenómenos asociados a la progresión tumoral, entre los aspectos mencionados se encuentra la migración e invasión celular, que guardan relación de forma importante con la vía de señalización FAK/Src, por lo tanto, se llevaron a cabo una serie de pruebas de docking molecular con los triazaspiranos propuestos y las proteínas de interés FAK y Src de la vía previamente mencionada, encontrando el grado de interacción entre los compuestos analizados y con ello dilucidar un posible efecto regulatorio en la activación de la vía de señalización.

5.1.1 Docking molecular: TRI-SR vs FAK

Se llevó a cabo el análisis de docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína FAK, obtenida del Protein Data Bank: 1MP8 Crystal structure of Focal Adhesion Kinase (FAK) PDB DOI: 10.2210/pdb1MP8/pdb. En la Tabla 1 se pueden observar las tres interacciones de mayor afinidad entre los conformeros del TRI-SR y la proteína FAK, el menor valor obtenido fue de un E-score de -10.4212 kcal/mol mayor afinidad, representado en la Figura 6, por otro lado, en la Figura 7 se muestra la interacción de afinidad media -10.2367 kcal/mol y en la Figura 8 describe la interacción de menor afinidad -9.8558 kcal/mol.

Tabla 1. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína FAK.

Análisis	E-Score (kcal/mol)
FAK TRI-SR (1)	-10.4212
FAK TRI-SR (2)	-10.2367
FAK TRI-SR (3)	-9.8558

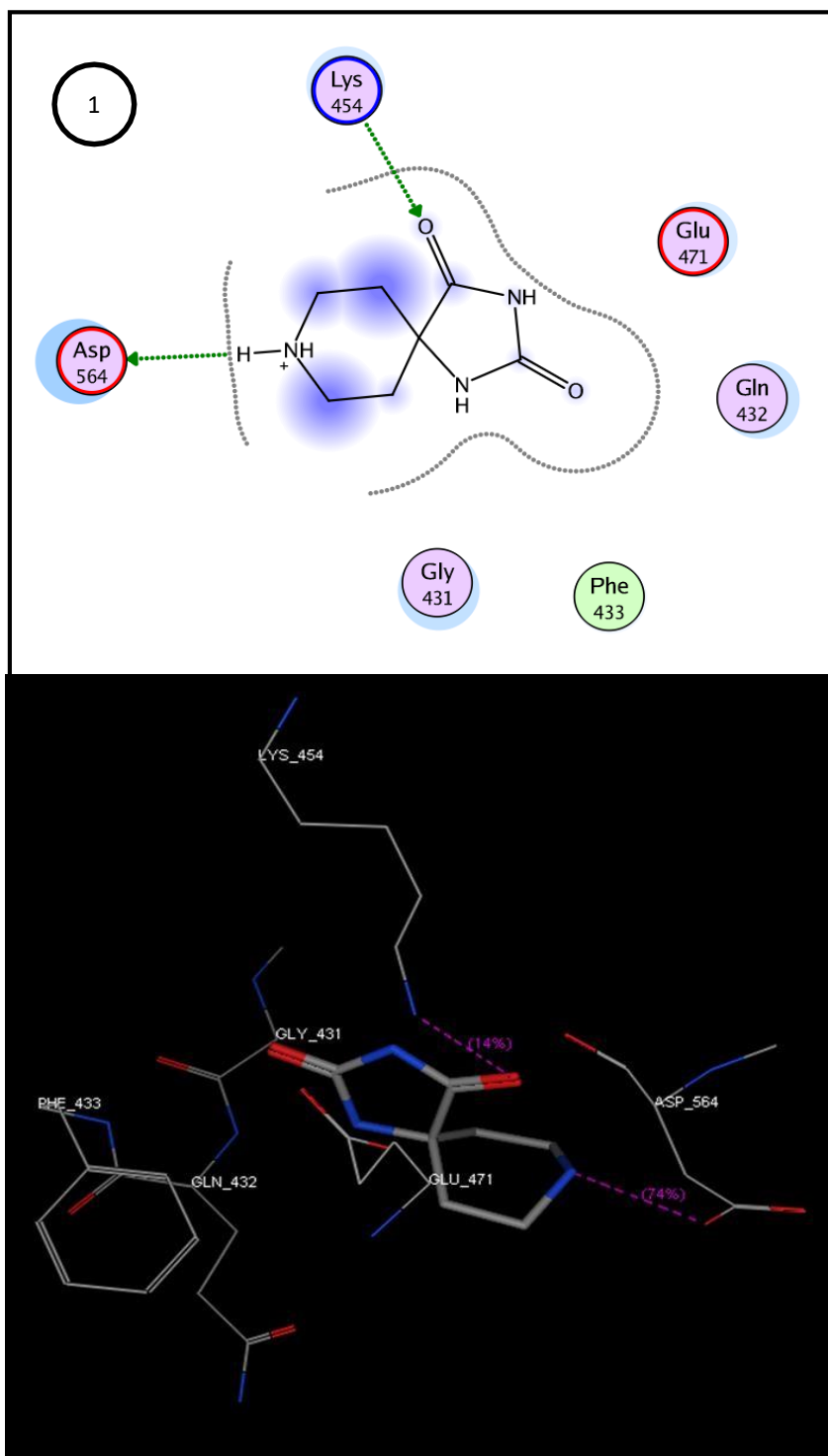


Figura 6. Docking molecular 1 del TRI-SR y la proteína FAK. Representa la interacción de mayor afinidad (E-score: -10.4212 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

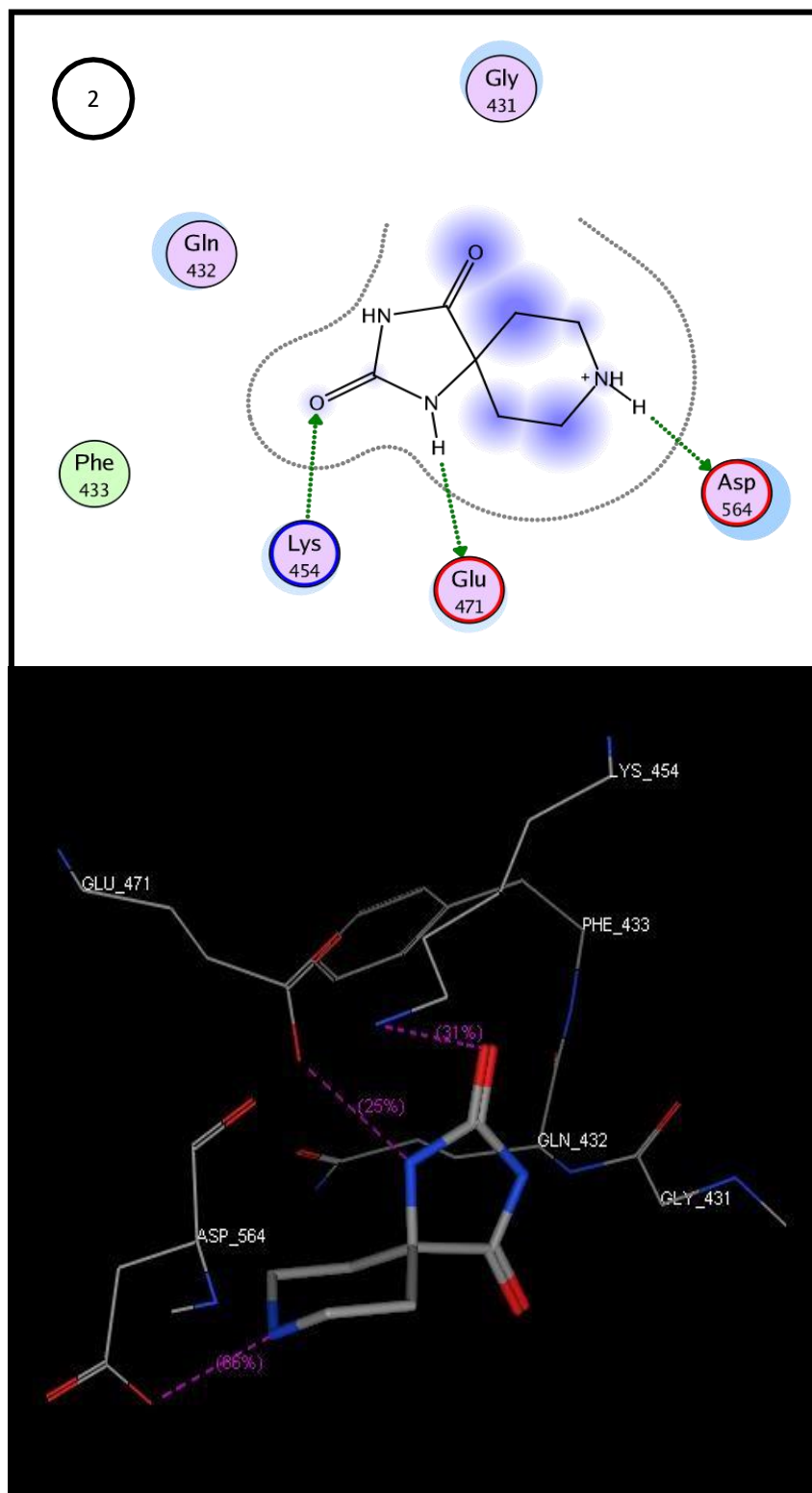


Figura 7. Docking molecular 2 del TRI-SR y la proteína FAK. Representa la interacción afinidad media (E-score: -10.2367 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

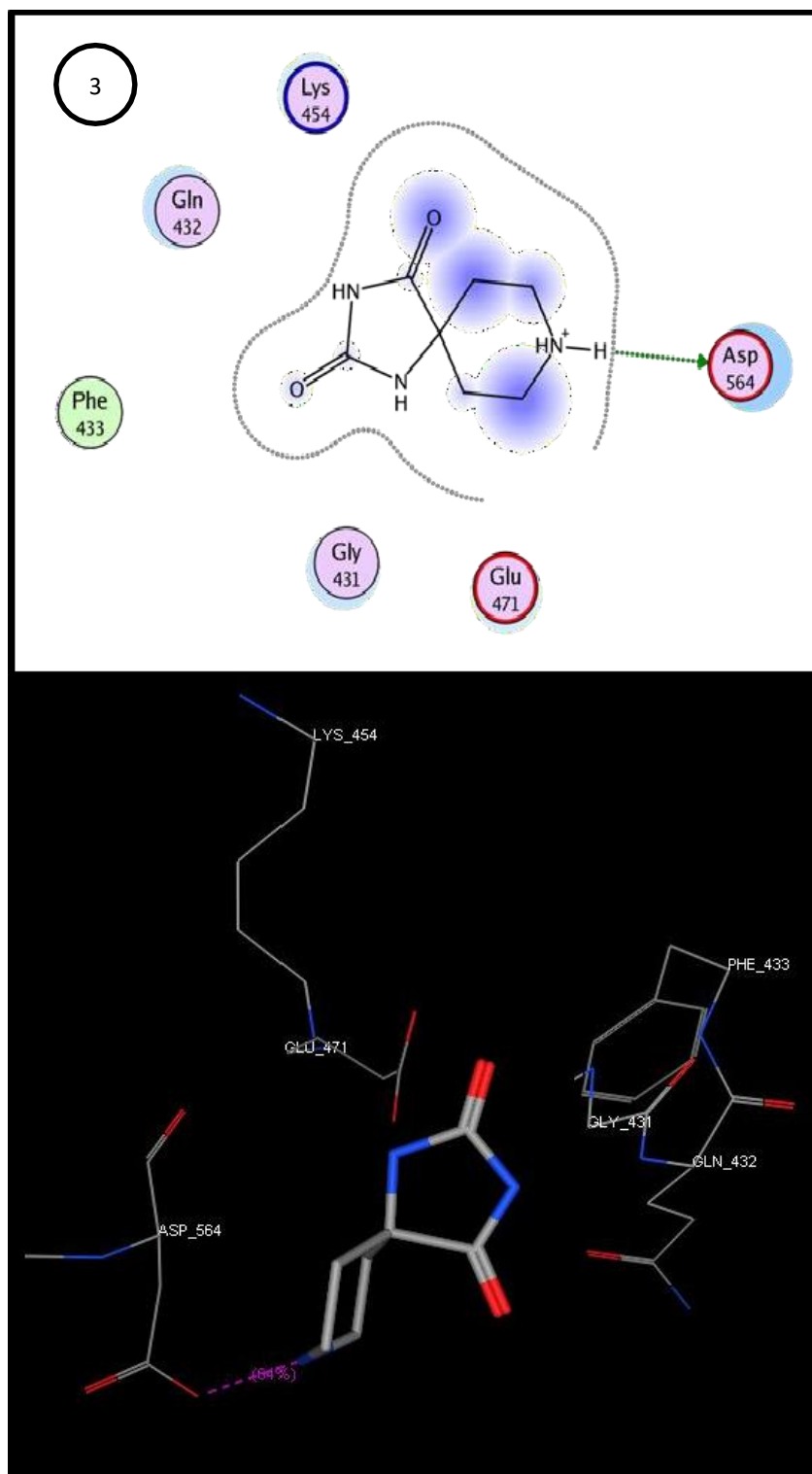


Figura 8. Docking molecular 3 del TRI-SR y la proteína FAK. Representa la interacción de menor afinidad (E-score: -9.8558 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

Se identificaron las interacciones de mayor importancia de los conformeros seleccionados (de mayor afinidad) del docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína FAK, presentándose las siguientes interacciones: En la Figura 6 se aprecia la interacción de la molécula TRI-SR con los residuos Asp 564 y Lys 454 ambos por enlace de puente de hidrogeno; en la Figura 7 se presentan las interacciones de TRI-SR con los residuos Asp 564, Lys 454 y Glu 471 todas estas interacciones mediadas por enlaces de tipo puente de hidrogeno; por otra parte, en la Figura 8 se encontró una vez más la afinidad por el residuo Asp 564, relacionado con interacción por puente de hidrogeno.

5.1.2 Docking molecular: TRI-BE vs FAK

Se analizó mediante docking molecular la interacción del TRI-BE y la proteína FAK, obtenida del Protein Data Bank: 1MP8 Crystal structure of Focal Adhesion Kinase (FAK) PDB DOI: 10.2210/pdb1MP8/pdb. Los resultados se muestran en la Tabla 3, donde se pueden observar las tres interacciones de mayor afinidad entre los conformeros obtenidos con la proteína FAK, el menor valor obtenido fue de un E-score de -7.7878 kcal/mol, representado en la Figura 9, seguido del conformero que presentó una interacción con un E-score de -7.7637 kcal/mol, el cual se muestra en la Figura 10 y finalmente en la Figura 11 se muestra la interacción con un E-Score de -7.6901 kcal/mol, que corresponde a la interacción del tercer conformero.

Tabla 2. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-BE y la proteína FAK.

Análisis	E-Score (kcal/mol)
FAK TRI-BE (1)	-7.7878
FAK TRI-BE (2)	-7.7637
FAK TRI-BE (3)	-7.6901

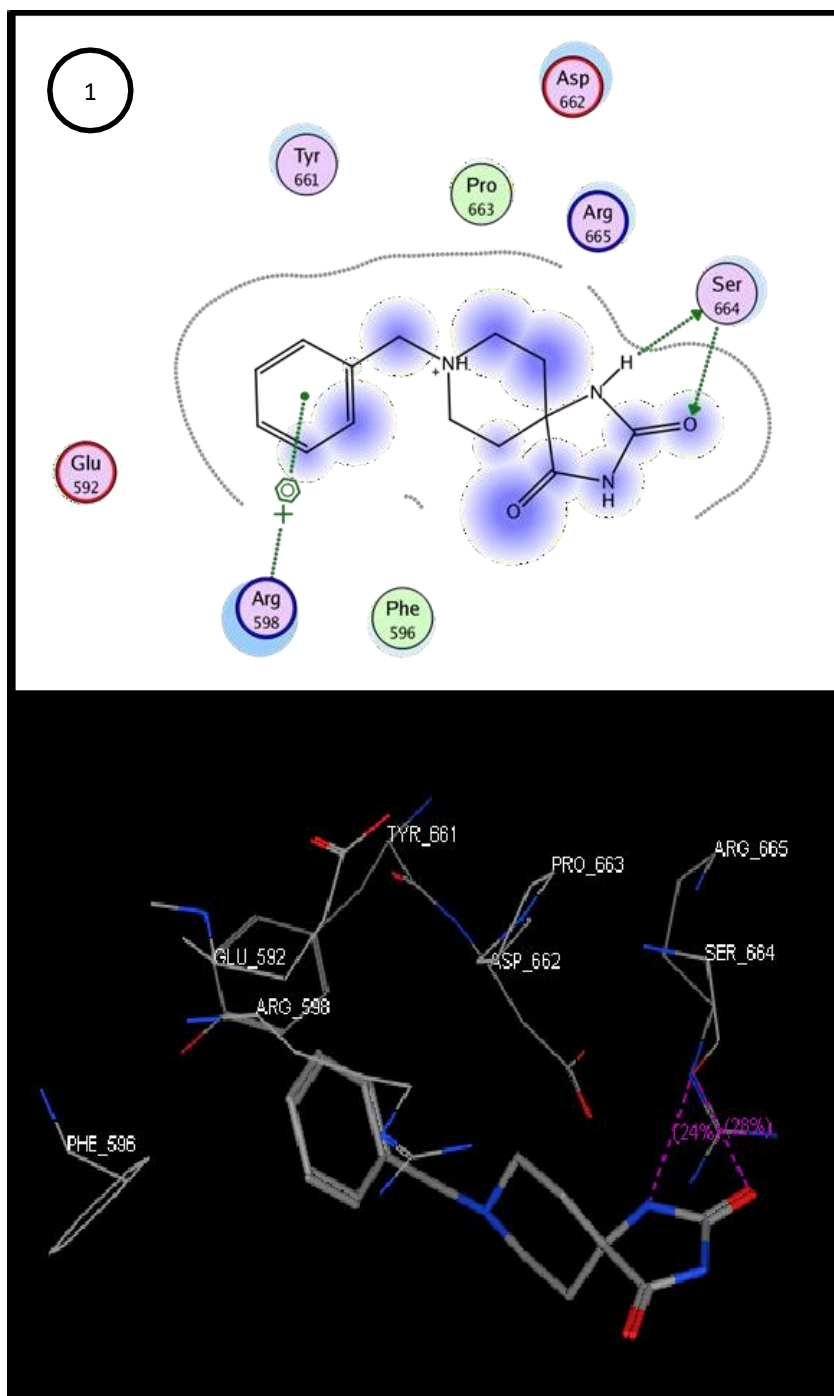


Figura 9. Docking molecular 1 del TRI-BE y la proteína FAK. Representa la interacción de mayor afinidad (E-score: -7.7878 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

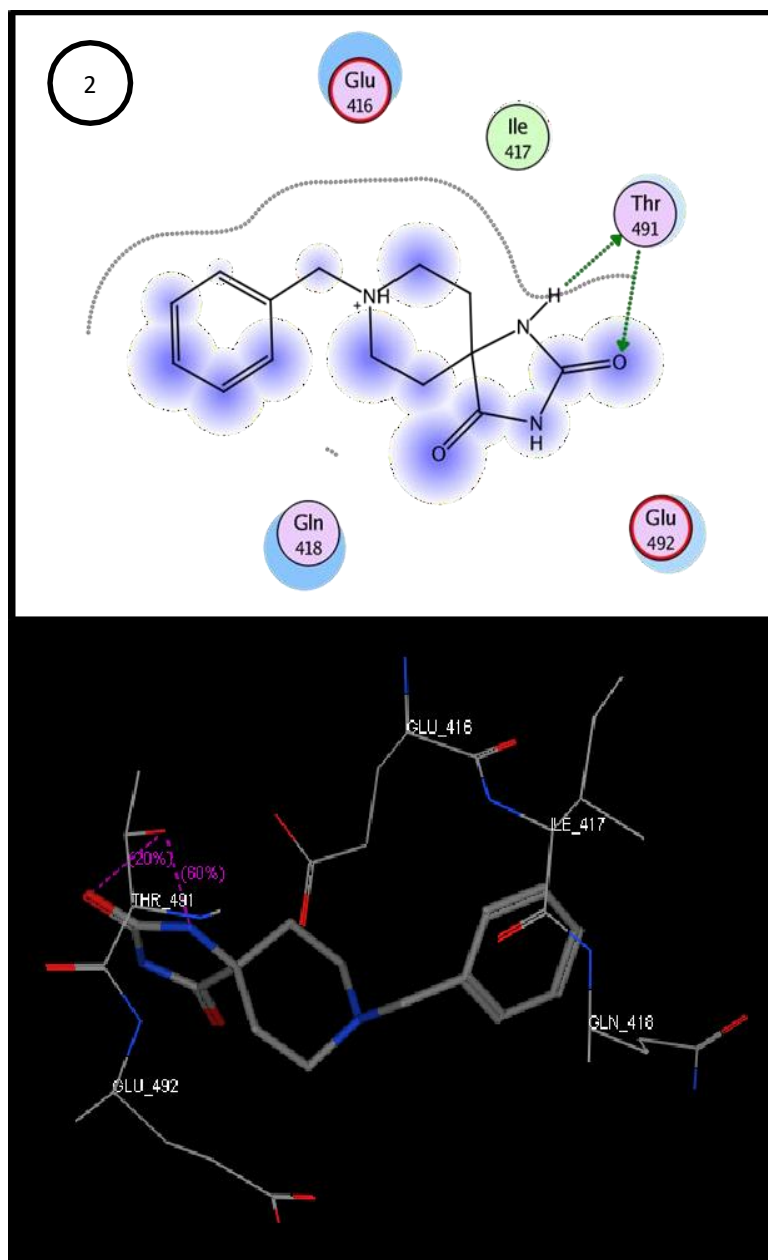


Figura 10. Docking molecular 2 del TRI-BE y la proteína FAK. Representa la interacción afinidad media (E-score: -7.7637 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

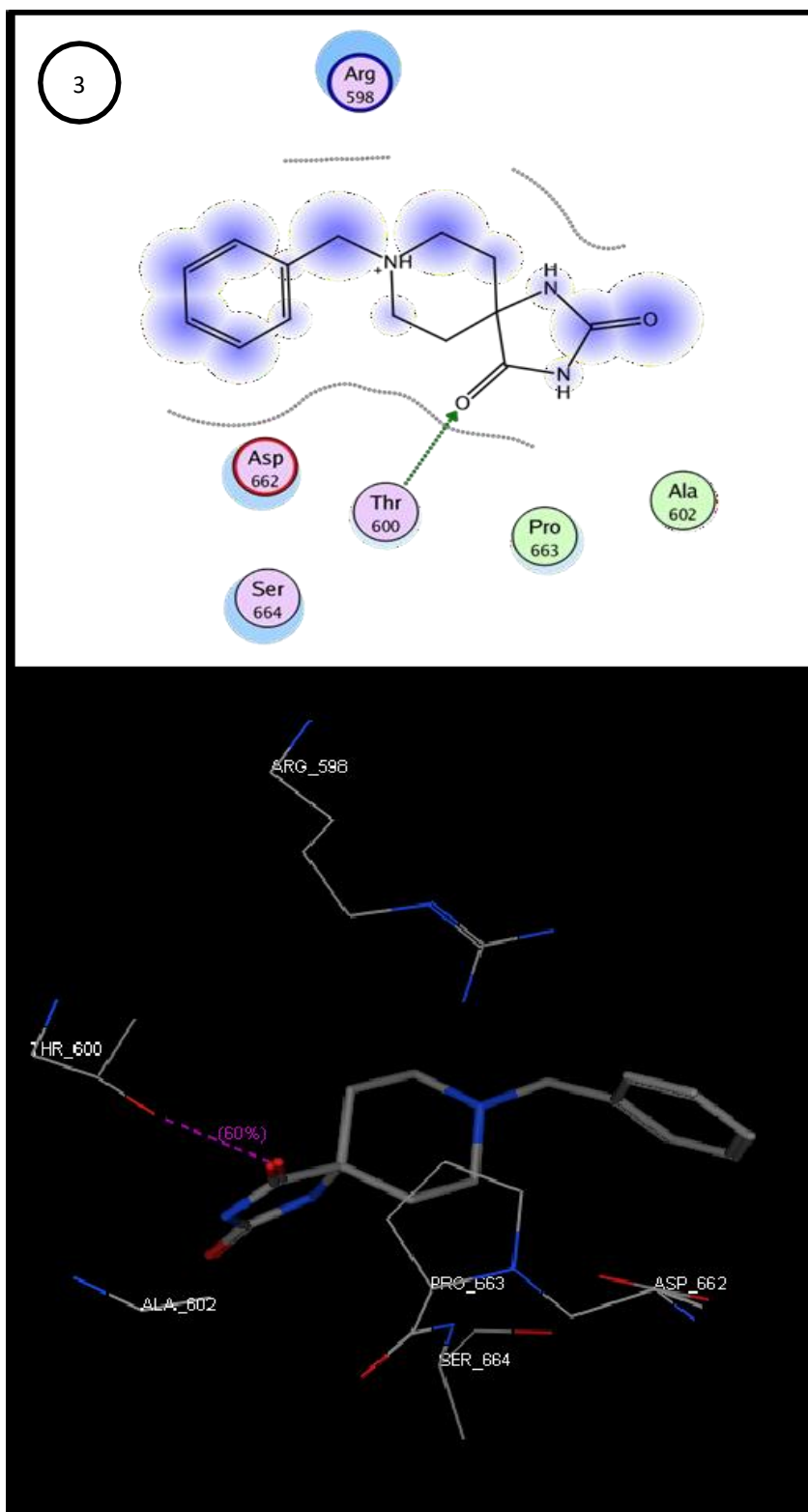


Figura 11. Docking molecular 3 del TRI-BE y la proteína FAK. Representa la interacción de menor afinidad (E-score: -7.6901 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

Las interacciones más representativas de los diferentes conformeros obtenidas del docking entre TRI-BE y FAK fueron las siguientes: En la figura 9 se observa una interacción catión-pi entre el TRI-BE y el residuo Arg 598, y una interacción por puente de hidrógeno entre el TRI-BE y el residuo Ser 664; la figura 10 mostró una interacción de enlace de hidrógeno entre el TRI-BE y el residuo Thr 491; y por último en la interacción representada en la figura 11 muestra la interacción mediada por el enlace de puente de hidrógeno entre el TRI-BE y la cadena lateral Thr 600.

5.1.3 Docking molecular: TRI-SR vs Src

Se analizó a la molécula TRI-SR por medio de docking molecular contra la proteína Src, obtenida de la base de datos PDB, la proteína seleccionada fue 1FMK Crystal Structure of Human Tyrosine-Protein Kinase C-Src PDB DOI: 10.2210/pdb1FMK/pdb. Los resultados de E-score se muestran en la Tabla 3 donde se observan los tres valores de mayor afinidad en el docking. La Figura 12 muestra la interacción de mayor afinidad -7.6199 kcal/mol, la Figura 13 presenta la interacción de valor medio -6.7780 kcal/mol, y la Figura 14 la de menor interacción -5.6499 kcal/mol.

Tabla 3. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-SR y la proteína Src.

Análisis	E-Score (kcal/mol)
Src TRI-SR (1)	-7.6199
Src TRI-SR (2)	-6.7780
Src TRI-SR (3)	-5.6499

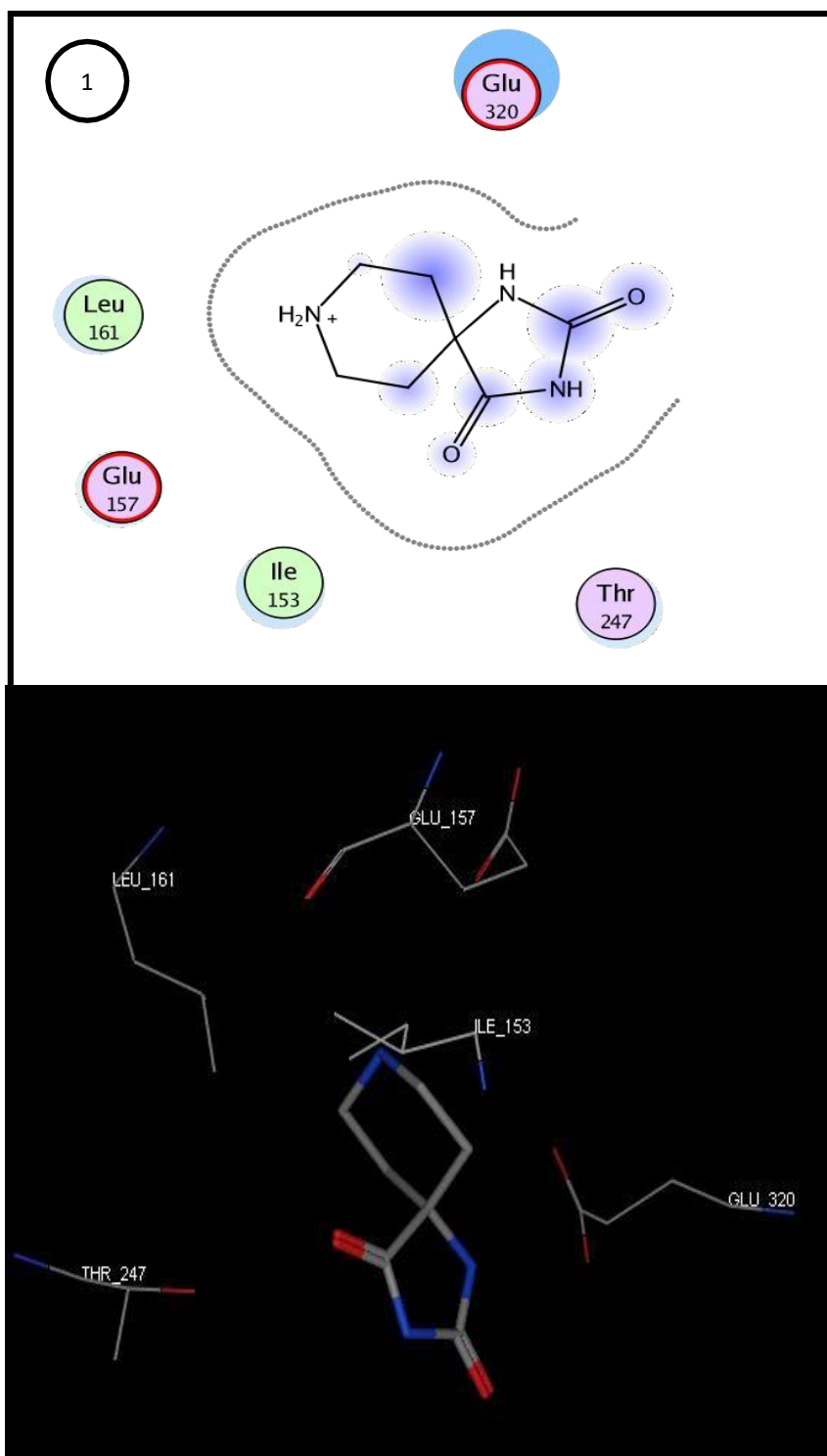


Figura 12. Docking molecular 1 del TRI-SR y la proteína Src. Representa la interacción de mayor afinidad (E-score: -7.6199 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

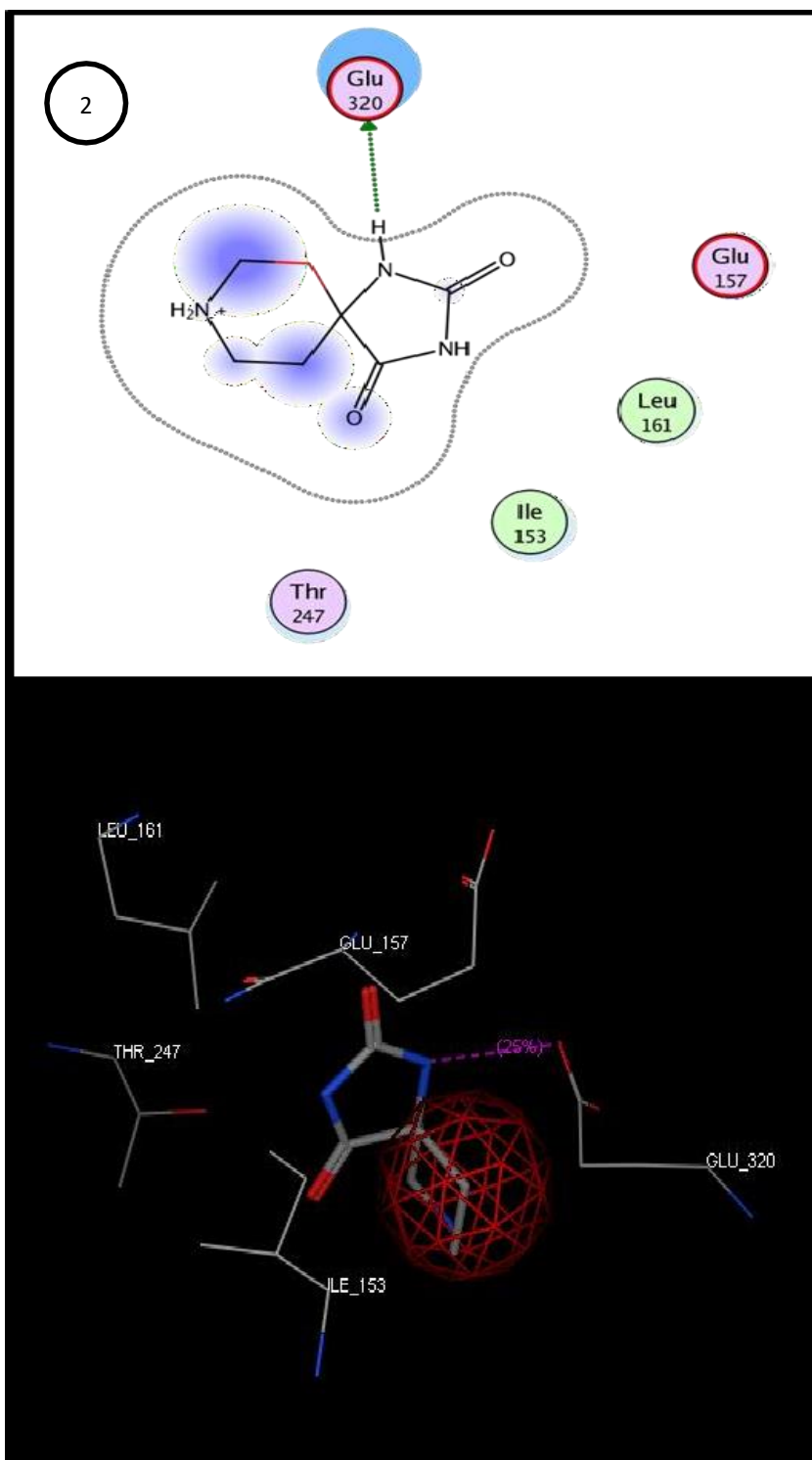


Figura 13. Docking molecular 2 del TRI-SR y la proteína Src. Representa la interacción de afinidad media (E-score: -6.7780 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

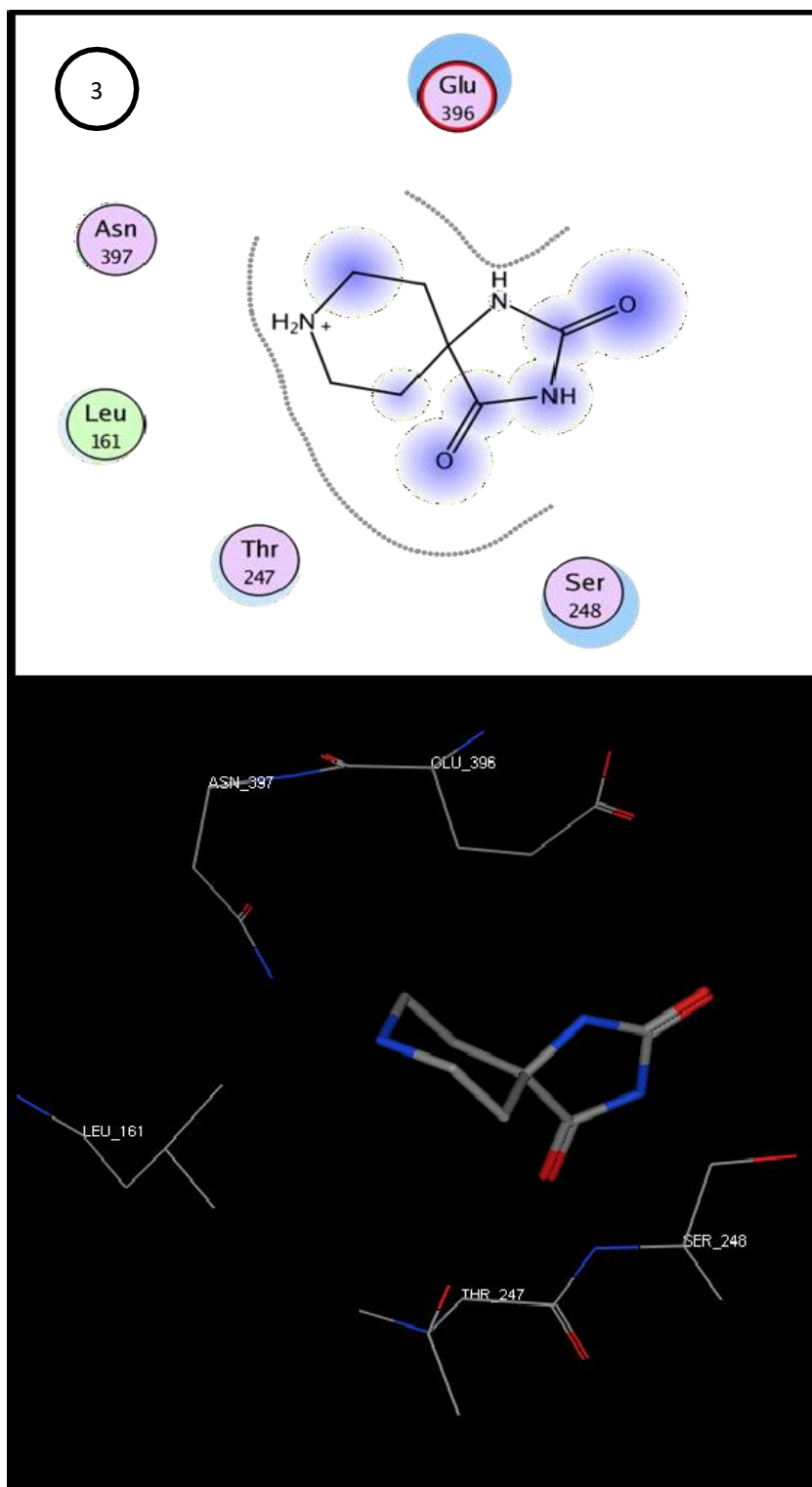


Figura 14. Docking molecular 3 del TRI-SR y la proteína Src. Representa la interacción de menor afinidad (E-score: -5.6499 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

Dentro de las interacciones más importantes del docking entre TRI-SR y Src se destacan a continuación: Se observa que en las figuras 12 y 14 no hay interacciones directas entre la molécula evaluada TRI-SR y la proteína Src, mientras que en la figura 13, hay una interacción por puente de hidrogeno entre el aminoácido Glu 320 de la proteína Src.

5.1.4 Docking molecular: TRI-BE vs Src

En este docking molecular se estudió la interacción de la molécula TRI-BE contra la proteína Src, obtenida de la base de datos PDB, la proteína seleccionada fue 1FMK Crystal Structure of Human Tyrosine-Protein Kinase C-Src PDB DOI: 10.2210/pdb1FMK/pdb. La Tabla 4 muestra los tres resultados de E-score más significativos. La Figura 15 muestra la interacción de mayor afinidad -8.2888 kcal/mol, la Figura 16 señala la interacción de valor medio -7.9860 kcal/mol y la Figura 17 la de menor interacción -7.8069 kcal/mol.

Tabla 4. Valores de E-score de mayor afinidad del docking molecular entre la molécula TRI-BE y la proteína Src.

Análisis	E-Score (kcal/mol)
Src TRI-BE (1)	-8.2888
Src TRI-BE (2)	-7.9860
Src TRI-BE (3)	-7.8069

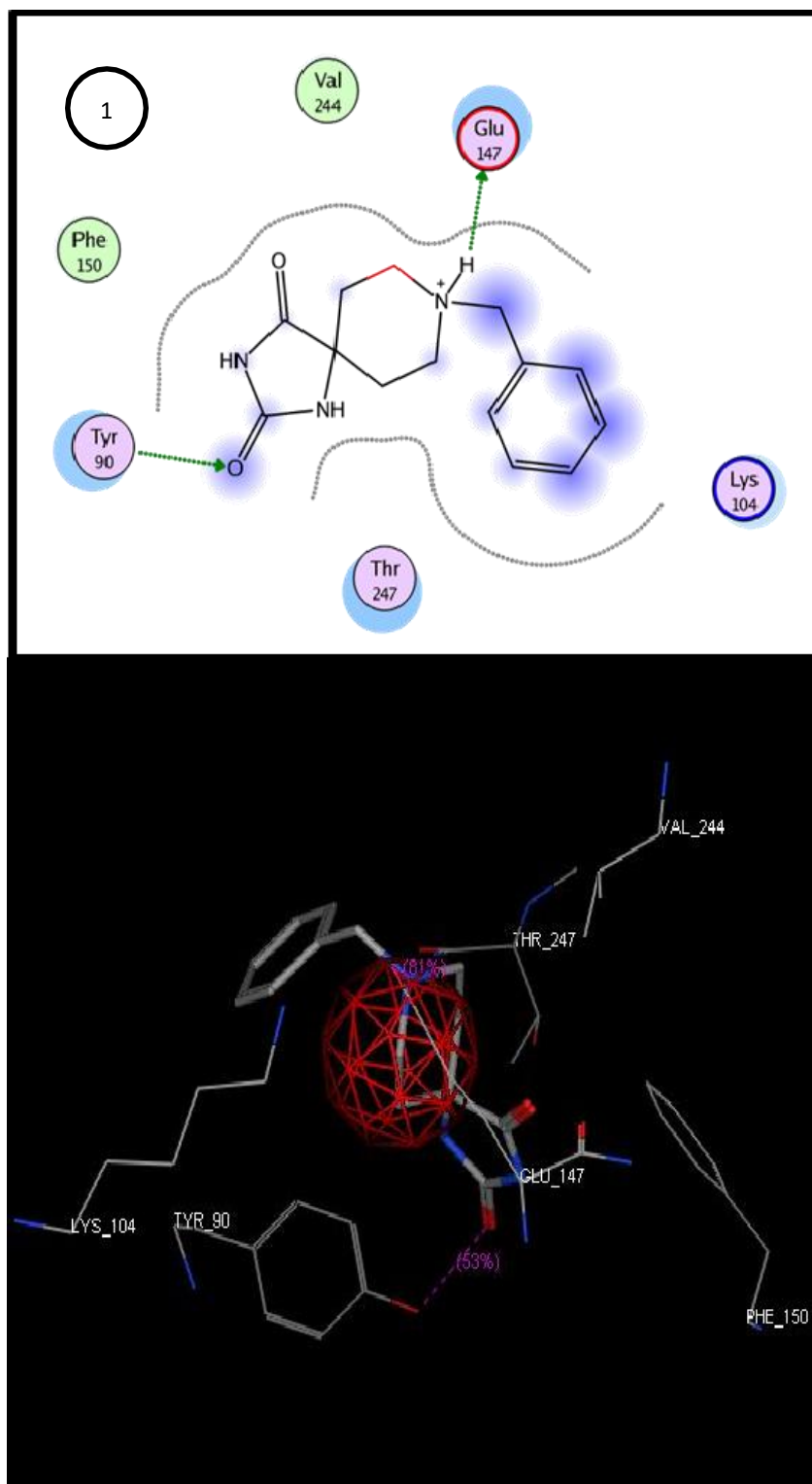


Figura 15. Docking molecular 1 del TRI-BE y la proteína Src. Representa la interacción de mayor afinidad (E-score: -8.2888 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

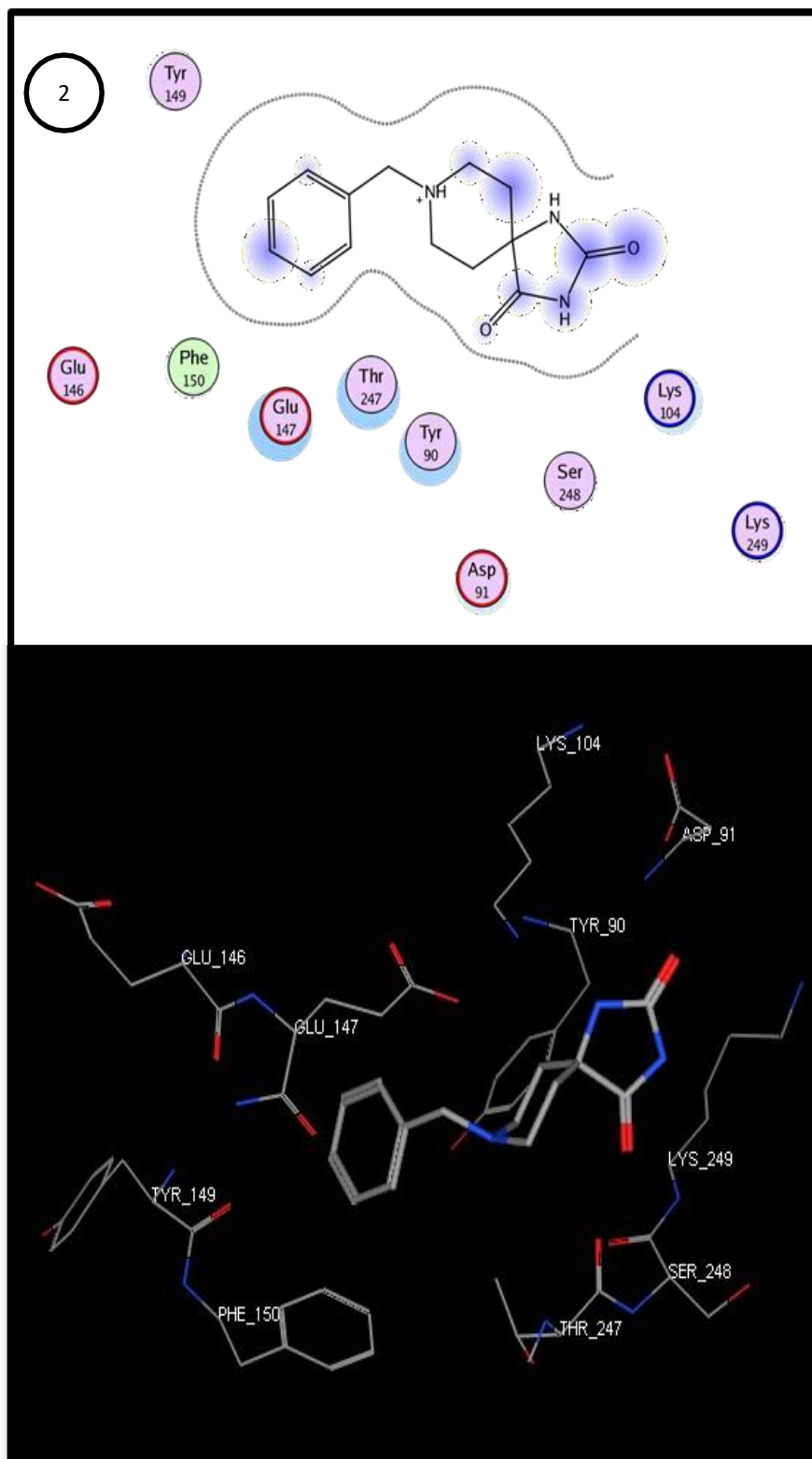


Figura 16. Docking molecular 2 del TRI-BE y la proteína Src. Representa la interacción de afinidad media (E-score: -7.9860 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

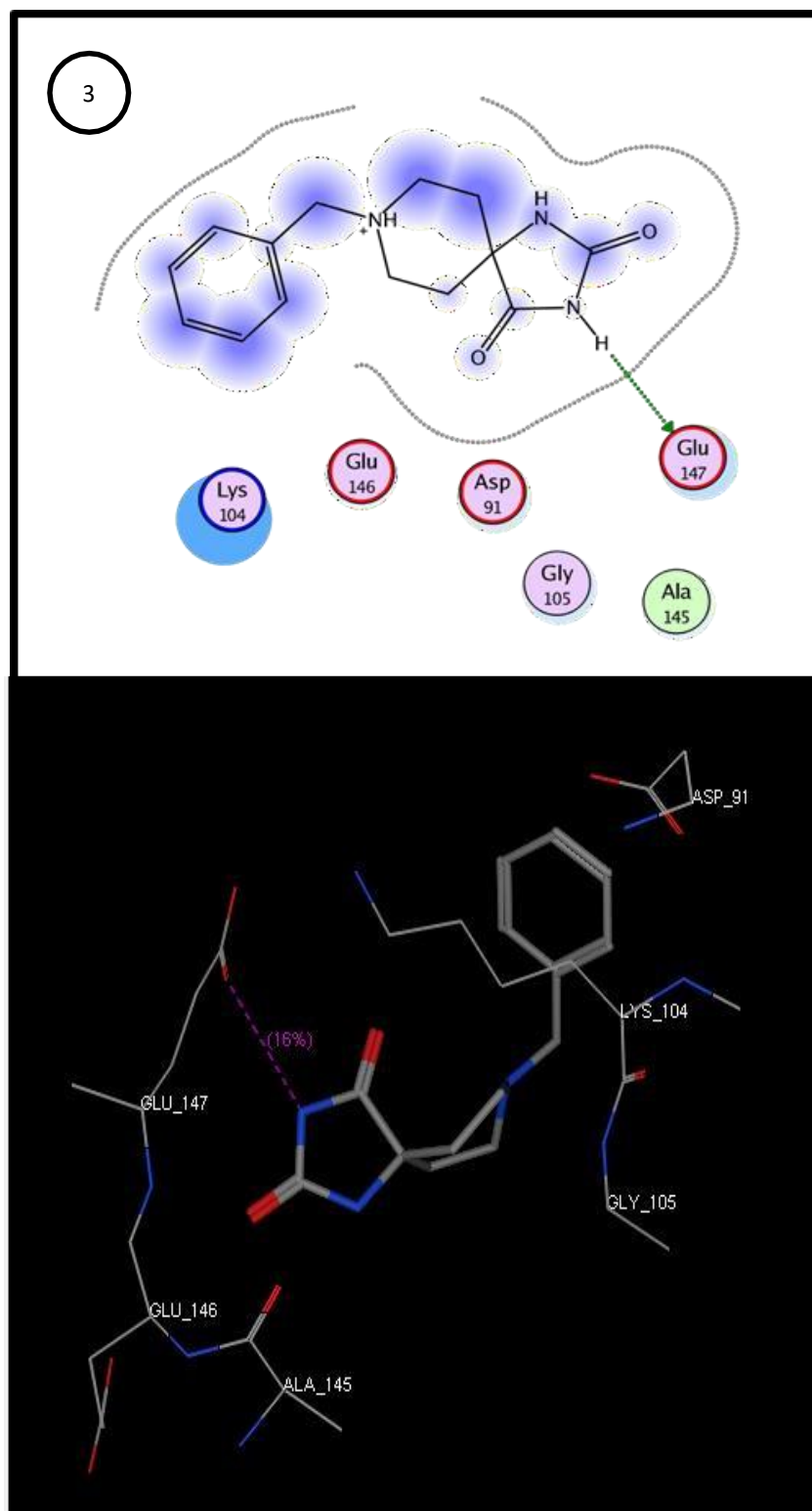


Figura 17. Docking molecular 3 del TRI-BE y la proteína Src. Representa la interacción de menor afinidad (E-score: -7.8069 kcal/mol). En la parte superior se muestra el análisis en 2D y en la parte inferior se muestra en 3D.

Las interacciones más representativas de los diferentes conformeros de TRI-BE y Src fueron las siguientes: en la figura 15 se representa una interacción por enlace de hidrógeno entre TRI-BE y el residuo Glu 147 y otra interacción por enlace de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Tyr 90; en la figura 16 no se presentan interacciones directas entre TRI-BE y Src; y por último en la figura 17 hay una interacción de enlace de hidrógeno con el residuo Glu 147.

Como se menciona anteriormente se eligieron los tres conformeros con menor energía de unión, esto hace referencia a que son las formas con mayor grado de afinidad para unirse a los aminoácidos de una región en específico, en este caso las proteínas evaluadas FAK y Src. Estos valores están influenciados por las interacciones presentes en el acoplamiento, tal es el caso de las interacciones por fuerzas de van der Waals, electrostáticas, por puente de hidrogeno e hidrofóbicas (98).

Acorde a lo descrito en las interacciones de la Figura 18A, se puede establecer, al menos teóricamente, en el acoplamiento de FAK hay una gran afinidad por la región de dominio kinasa, dicha región se ha reportado es una importante región moduladora para la máxima actividad catalítica de la proteína, proteínas de unión al sitio como FIP200 ha demostrado que dicha interacción provoca una inhibición de la actividad catalítica en FAK (99).

Por otra parte, en el acoplamiento con la proteína Src en la Figura 18B, los conformeros seleccionados muestran mayor afinidad por los dominios SH2 y SH3, estos a su vez son sitios de unión a la proteína FAK, siendo la proteína Src responsable de la fosforilación de los residuos Tyr 576 y Tyr 577 en FAK, encargados de activar la mayor capacidad catalítica y por lo tanto un incremento en la vía de señalización FAK/Src (66).

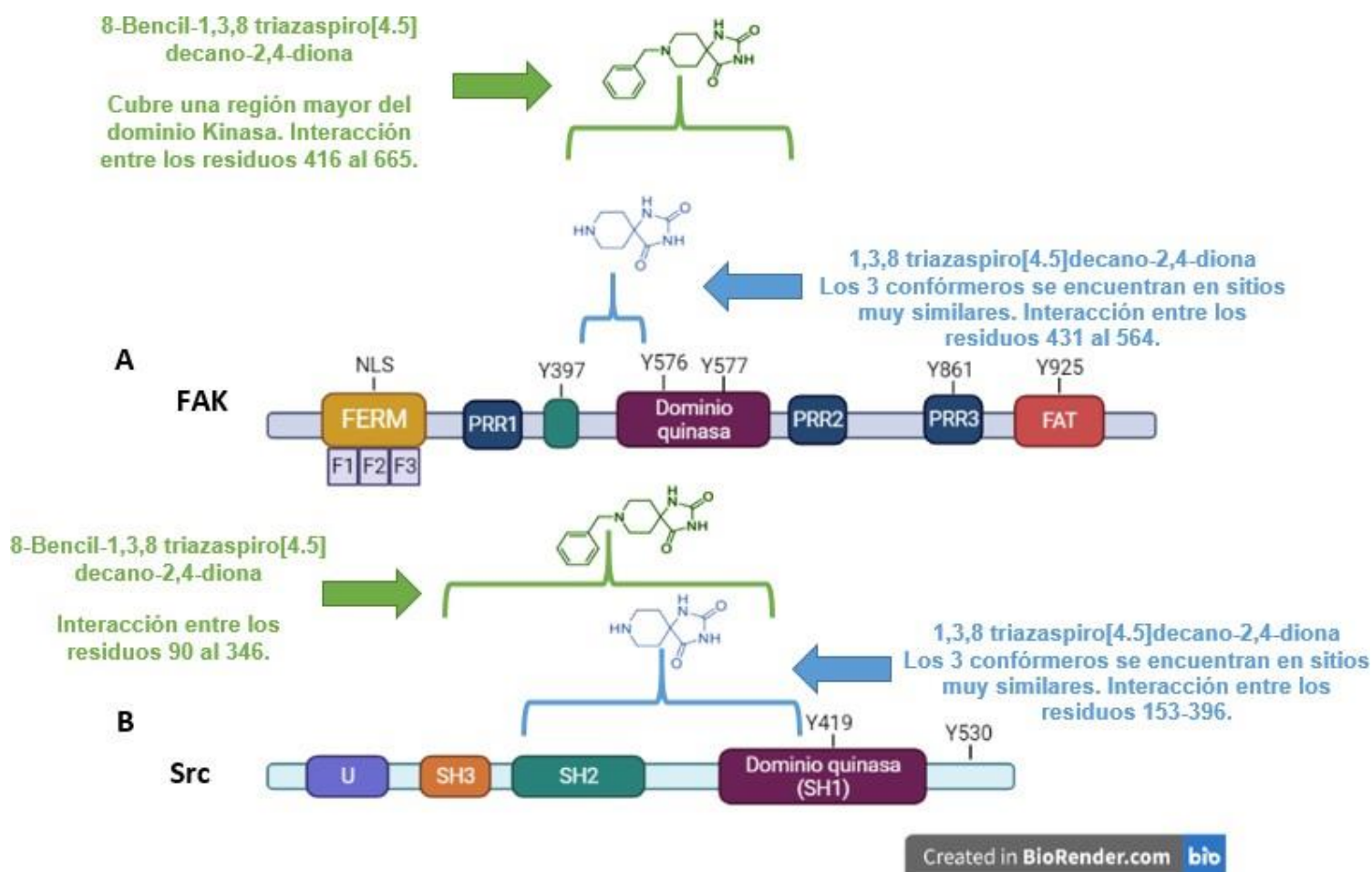


Figura 18. Interacciones teóricas entre las moléculas TRI-BE, TRI-SR y las proteínas FAK (A) y Src (B) evaluadas mediante docking molecular.

5.2 Ensayo de viabilidad celular (Ensayo de MTT)

El análisis de viabilidad celular es un estudio importante para identificar posibles efectos citotóxicos de los compuestos a evaluar, por ello se evaluó el impacto del TRI-BE en la viabilidad celular. Nuestros datos que se muestran en la Figura 19 indican que TRI-BE 10 μ M (concentración empleada en los ensayos posteriores) no afecta la viabilidad de las células PC3. Lo que fue punto de partida para comenzar con los ensayos de actividad biológica de migración e invasión celular.

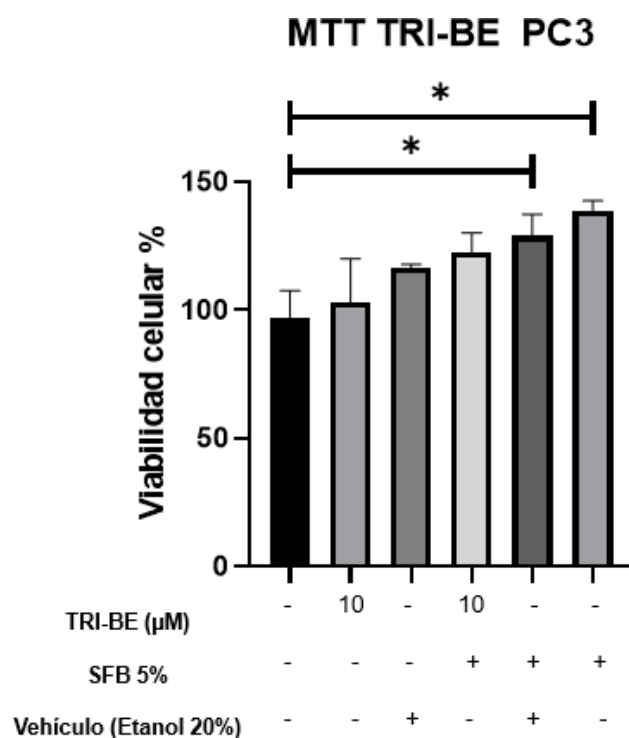


Figura 19. Ensayo de viabilidad celular por MMT. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (Control) Opti-MEM; (TRI-BE 10 μ M) 10 μ M TRI-BE + Opti-MEM; (Vehículo) Opti-MEM + Etanol 20%, (TRI-BE 10 μ M/SFB) 10 μ M TRI-BE + Opti-MEM + SFB 5%; (Vehículo/SFB) Opti-MEM + Etanol 20% + SFB 5%; (SFB) Opti-MEM + SFB 5%. La gráfica representa las medias de cada condición $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino, D.E.= Desviación estándar. Los asteriscos denotan significancia estadística *P<0.05, evaluado mediante una ANOVA de una vía, con una prueba de Dunnett.

5.3 Ensayo de migración celular (Ensayo de cierre de herida)

La metástasis es la mayor causa de muerte en pacientes con cáncer (82), siendo la migración e invasión celular y la intravasación a vasos sanguíneos y linfáticos algunos de los factores característicos del fenómeno metastásico (76), por lo tanto, se consideró crucial el estudiar el fenómeno migratorio en las células tumorales, por ser un punto determinante para dar inicio al desarrollo de la metástasis.

5.3.1 Ensayo de migración celular: TRI-SR

La molécula TRI-SR mostró capacidad inhibitoria en las células tumorales prostáticas PC3. En la Figura 20 panel A se puede observar el efecto inhibitorio en función de las diversas concentraciones empleadas (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M), en un curso temporal de 24 horas de estímulo con la molécula TRI-SR, siendo la concentración de 10 μ M la que mostró una significancia estadística mayor con respecto a las demás condiciones, en la Figura 20 panel B, la gráfica fue obtenida a través de al menos tres experimentos independientes por medio de una ANOVA de una vía.

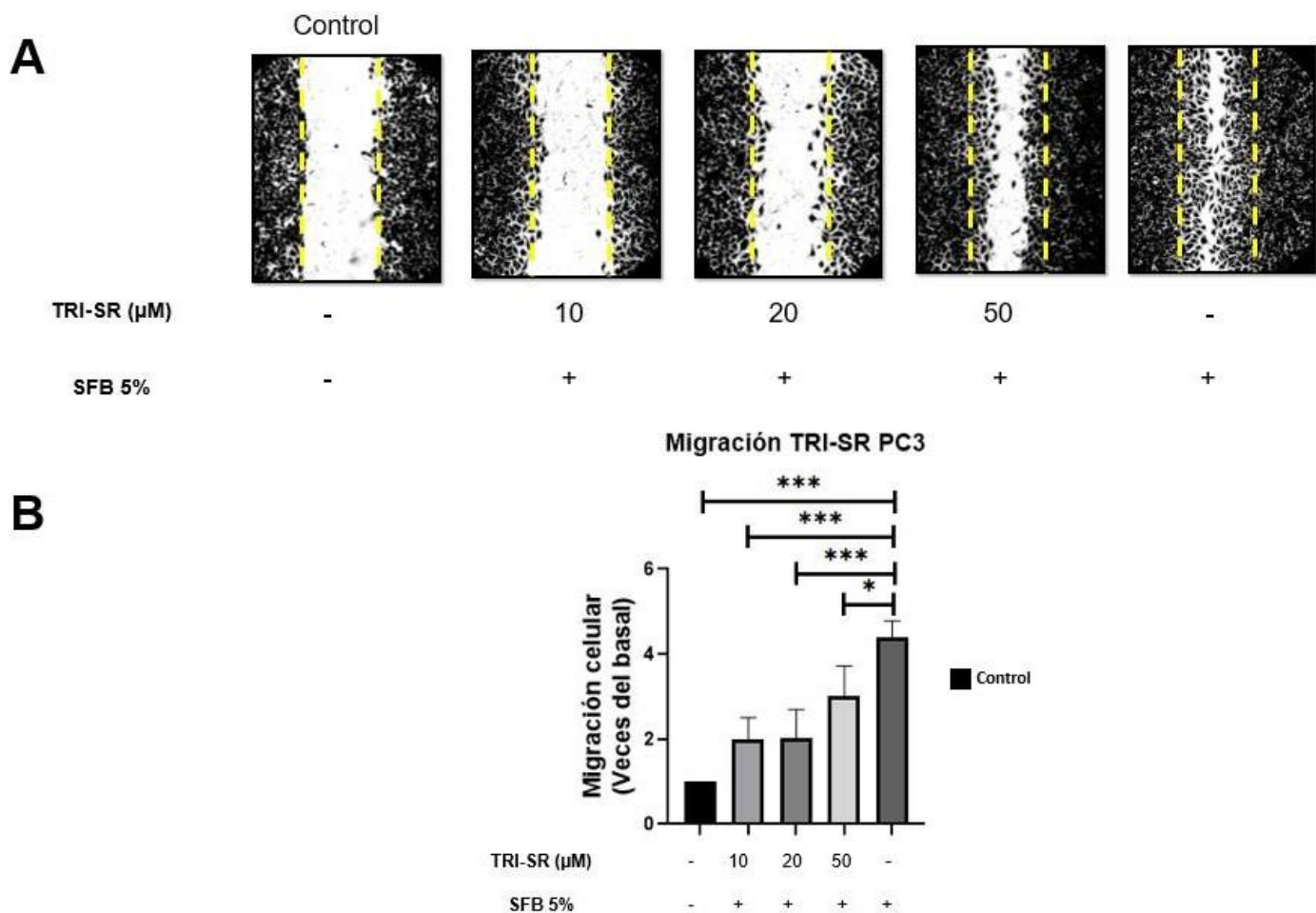


Figura 20. Evaluación del TRI-SR en ensayo de migración celular. A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (Control) DMEM; (TRI-SR 10 μM) 10 μM TRI-SR + DMEM + SFB 5%; (TRI-SR 20 μM) 20 μM TRI-SR + DMEM + SFB 5%; (TRI-SR 50 μM) 50 μM TRI-SR + DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (Vehículo) DMEM + Etanol 20%. B) La gráfica representa las medias de cada condición $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino, D.E.= Desviación estándar. Los asteriscos denotan significancia estadística ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía, con una prueba de Dunnett.

5.3.2 Ensayo de migración celular: TRI-BE

El TRI-BE mostró una importante capacidad inhibitoria en las células tumorales prostáticas PC3, el efecto del triazaspirano fue concluyente en las diversas concentraciones empleadas (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M), como se puede observar en la Figura 21 panel A, no obstante, a la concentración de 50 μ M es donde se pudo observar el mayor efecto inhibitorio. En la Figura 21 panel B se muestran las significancias estadísticas en todas las condiciones evaluadas, esto a partir de por al menos tres experimentos independientes.

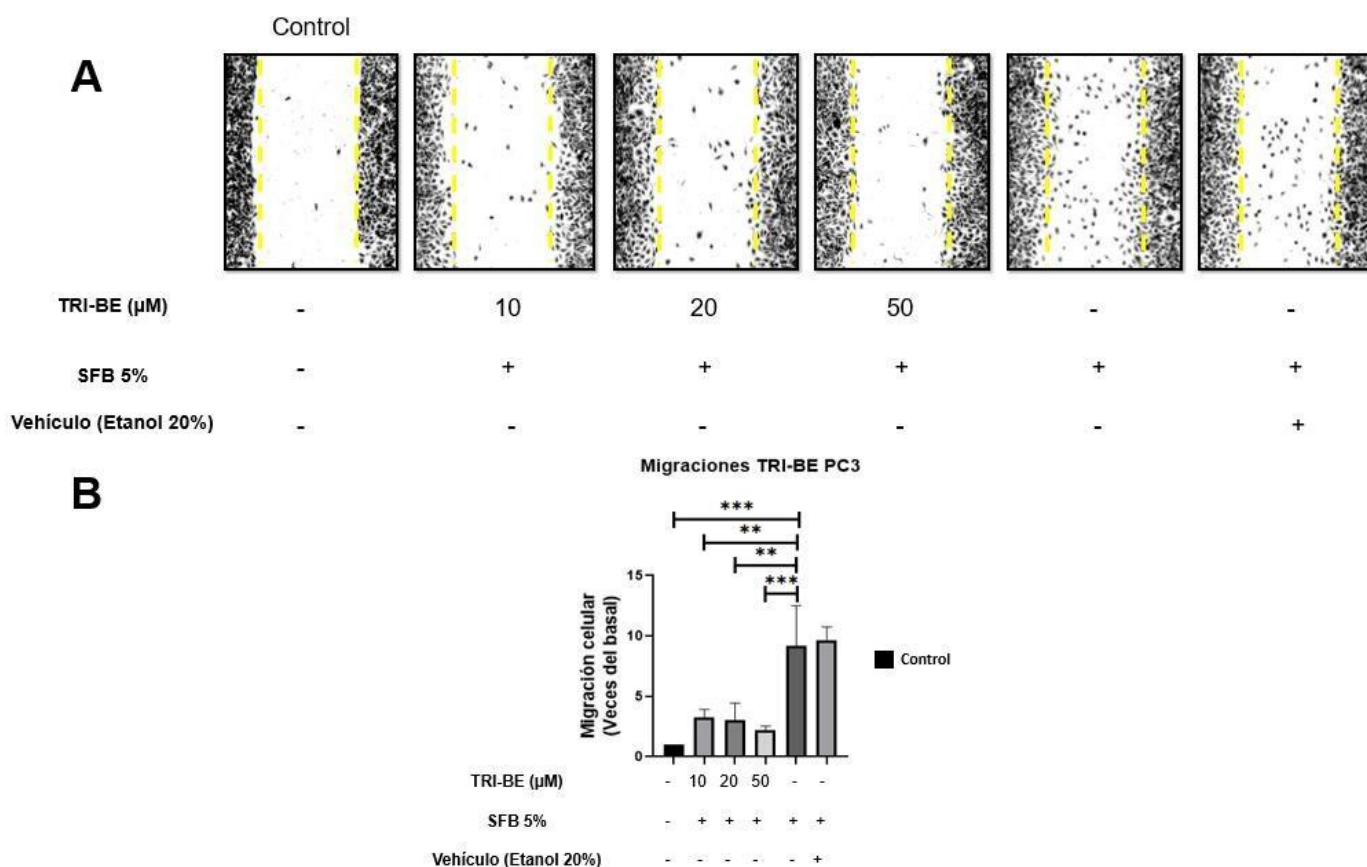


Figura 21. Evaluación del TRI-BE en ensayo de migración celular. Panel A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; 10 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; 20 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; 50 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. Panel B) la gráfica representa las $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha son: (CTRL) DMEM; 10 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; 20 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; 50 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino, VEH= Vehículo. Los asteriscos denotan significancia estadística * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.4 Ensayo de invasión celular (Ensayo en cámara de Boyden)

La invasión celular es considerada como una característica que forma parte de los Hallmarks del cáncer además de que está asociada fuertemente al fenómeno de metástasis (31), por tal motivo, es importante estudiar dicha actividad, en la presente investigación nos dimos a la tarea de realizar un análisis sobre la capacidad invasora de las células tumorales prostáticas PC3 tras su estimulación con los triazaspiranos propuestos en la investigación.

5.4.1 Ensayo de invasión celular: TRI-SR

En el ensayo de invasión celular se encontró que la molécula TRI-SR tiene un efecto determinante en la supresión de la invasión celular, tras realizar un curso temporal estimulando por 24 horas a las células.

Se aprecia que el control positivo, con suero fetal bovino 5% en medio DMEM, promueve la invasión celular, sin embargo, en presencia del triazaspirano se observa un efecto de inhibición empleando la concentración de 10 μ M Figura 22 panel A. Esta concentración fue seleccionada con base en los resultados de los estudios de migración celular. En la Figura 22 panel B se observa que hay diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con el triazaspirano (10 μ M) y el control, lo que nos sugiere la efectividad del triazaspirano en la supresión de la invasión celular.

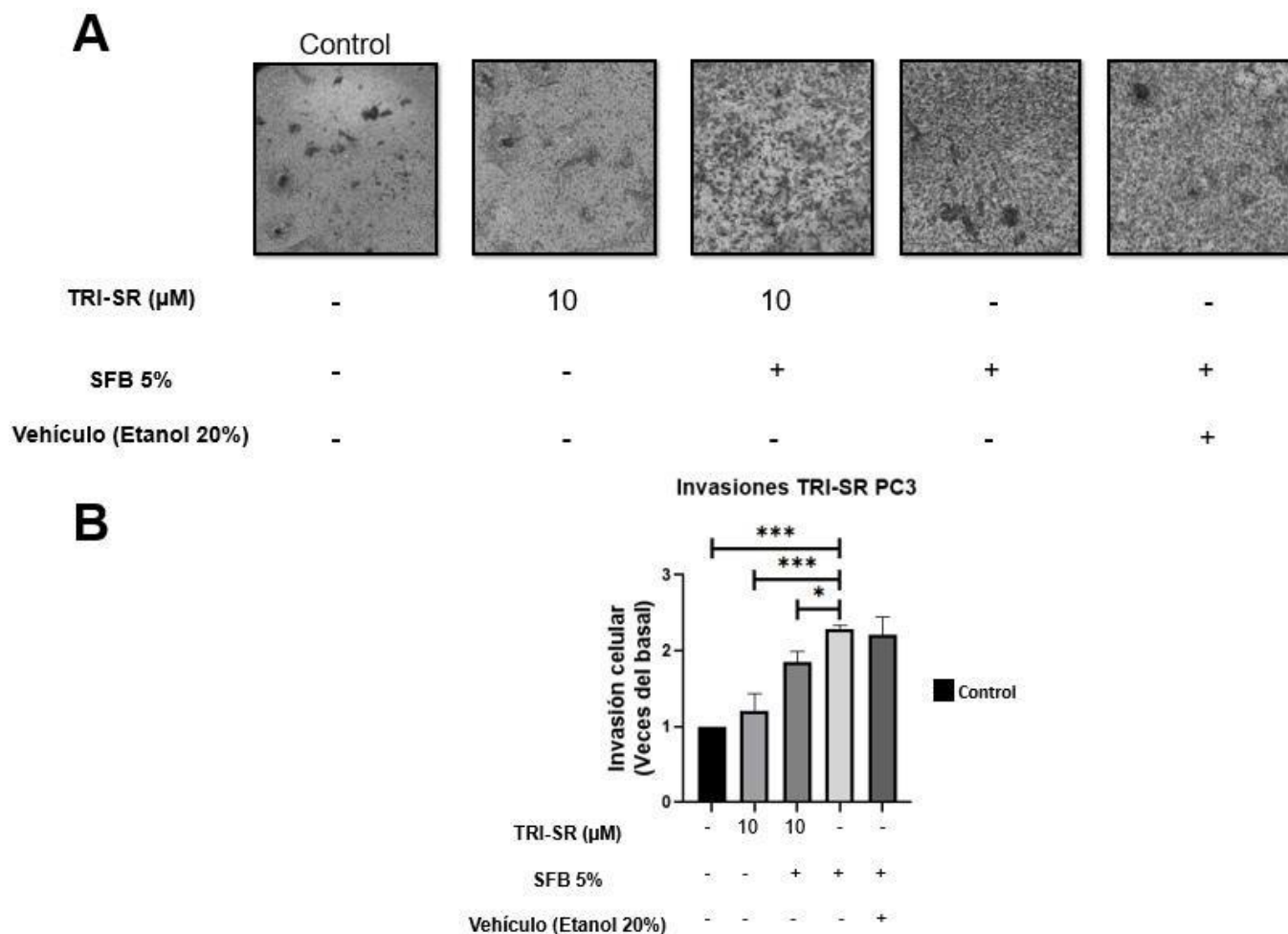


Figura 22. Ensayo de invasión celular: TRI-SR. Panel A) Curso temporal 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM -(SR DMEM) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM - (SR D/SFB) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%- (SFB) DMEM + SFB 5% - (VEH) DMEM + Etanol 20%. Panel B) La gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (SR DMEM) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (SR D/SFB) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. CTRL=Control, SFB=Suero fetal bovino, VEH= Vehículo. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.4.2 Ensayo de invasión celular: TRI-BE

En la Figura 23 panel A se muestran los resultados del ensayo de invasión celular del TRI-BE (10 μ M), en un curso temporal de 24 horas de estímulo, mostrando que hay una inhibición importante de la invasividad celular tras su aplicación con respecto al resultado obtenido cuando se utiliza únicamente suero fetal bovino al 5%. Los resultados que se muestran en la Figura 23 panel B fueron generados mediante tres ensayos independientes, obteniendo una significancia estadística importante, por lo que se determina que el triazaspirano bajo estas condiciones posee capacidad inhibitoria de la invasión celular.

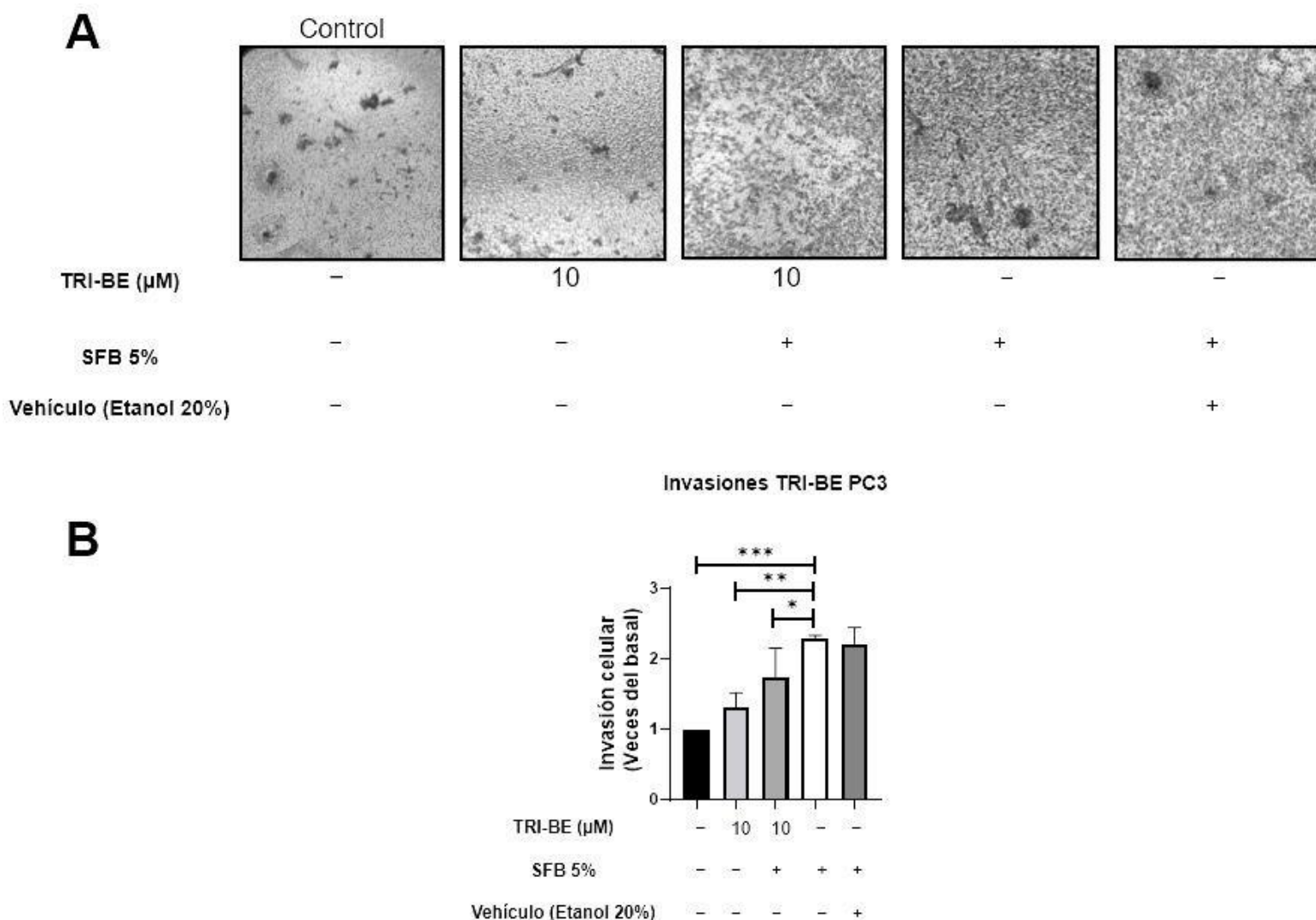


Figura 23. Ensayo de invasión celular: TRI-BE. Panel A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (BE DMEM) 10 μM 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (BE D/SFB) 10 μM 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. Panel B) la gráfica representa las $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (BE DMEM) 10 μM 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (BE D/SFB) 10 μM 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. CTRL=Control, SFB=Suero fetal bovino, VEH=Vehículo. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.5 Determinación de metaloproteinasas (MMP) 9 por zimografía

Tras la evaluación de algunos de los fenómenos de actividad biológica asociados al cáncer (migración e invasión), se optó también por analizar la segregación de metaloproteinasas en las células tumorales PC3 tratadas con los triazaspiranos investigados en el presente trabajo, ya que acorde a ciertos procesos de señalización celular en cáncer, esta descrito que hay una mayor cantidad de metaloproteinasas activas, las cuales tienen la capacidad de degradar la matriz extracelular, al punto de ser consideradas como un factor predictor en el desarrollo de la metástasis (83).

5.5.1 Determinación de MMP-9: TRI-SR

El zimograma de la Figura 24 panel A permite observar cómo la adicción del TRI-SR (10 μ M) genera una disminución de la segregación de MMP-9 en contraste con la condición control (DMEM). Por otro lado, es importante hacer mención que en las condiciones con suero fetal no se obtuvo un contraste ideal, debido al sesgo generado por las proteínas que se encuentran en el SFB, no obstante, en la determinación de la MMP-2, en la condición con el triazaspirano añadido se pudo apreciar también una disminución con respecto al control con SFB. Tras el análisis estadístico realizado con los resultados de por lo menos tres experimentos independientes, en el panel B de la Figura 24 se muestra una diferencia estadísticamente significativa que denota una supresión en la segregación de MMP'S como consecuencia de la actividad del triazaspirano.

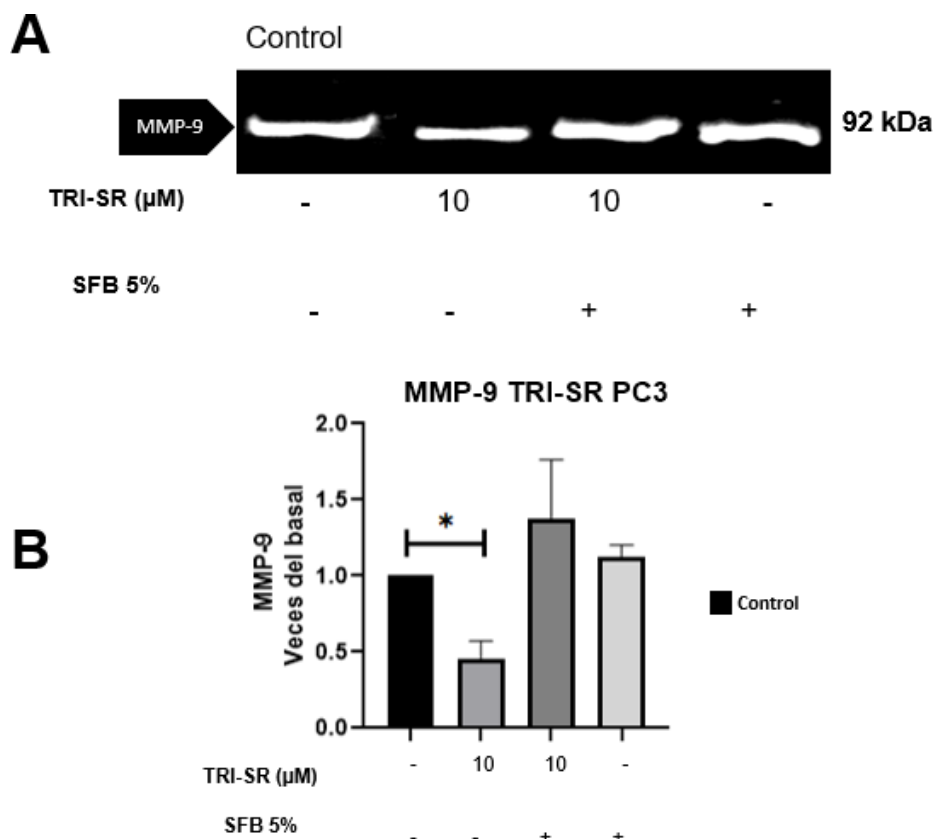


Figura 24. Determinación de MMP-9: TRI-SR. Panel A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (SR DMEM) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (SR D/SFB) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (SR DMEM) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (SR D/SFB) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.5.2 Determinación de la MMP-9: TRI-BE

El triazaspirano TRI-BE, a una concentración de 10 μ M, mostró un notable efecto supresor sobre la segregación de MMP- 9. En la Figura 25 panel A se detalla la capacidad inhibitoria observada en la condición BE DMEM, donde tras contrastar la presencia del triazaspirano contra el CTRL se puede apreciar la disminución en los cultivos de células tumorales PC3 tratados. En la Figura 25 panel B se puede observar que hay una reducción de más del 50% en la segregación de las enzimas colagenasas por efecto del triazaspirano. Se muestran los resultados de al menos tres estudios independientes.

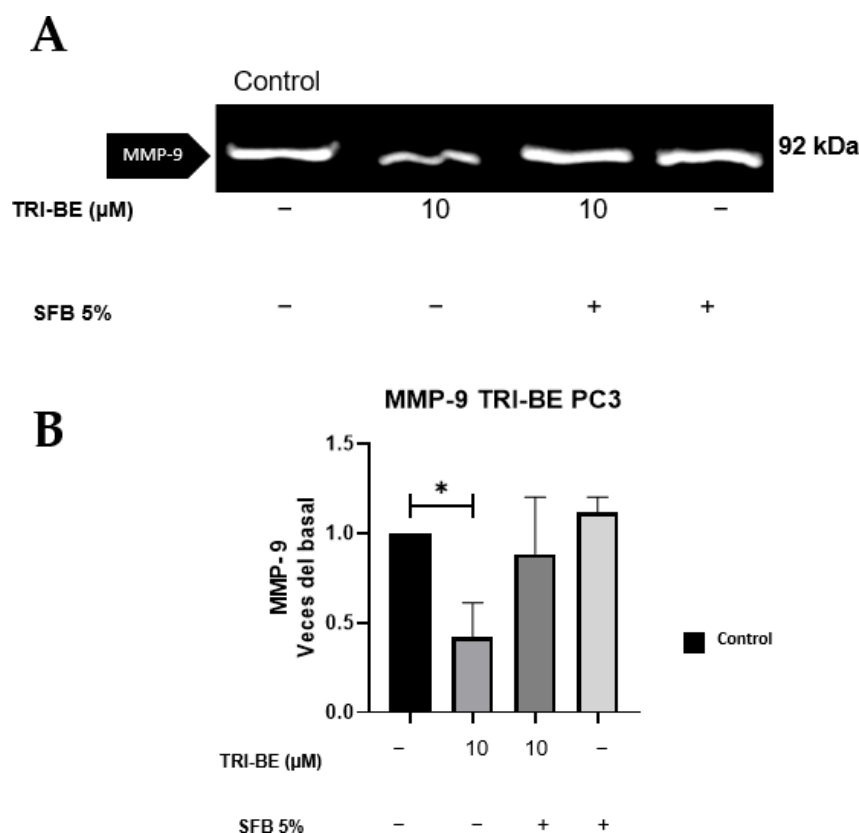


Figura 25. Determinación de MMP-9: TRI-BE. Panel A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; (BE DMEM) 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM; (BE D/SFB) 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM -(BE DMEM) 10 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona + DMEM -(BE D/SFB) 10 μ M 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%- (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL=Control SFB=Suerio fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.6 Determinación de la expresión proteica de las proteínas FAK y Src

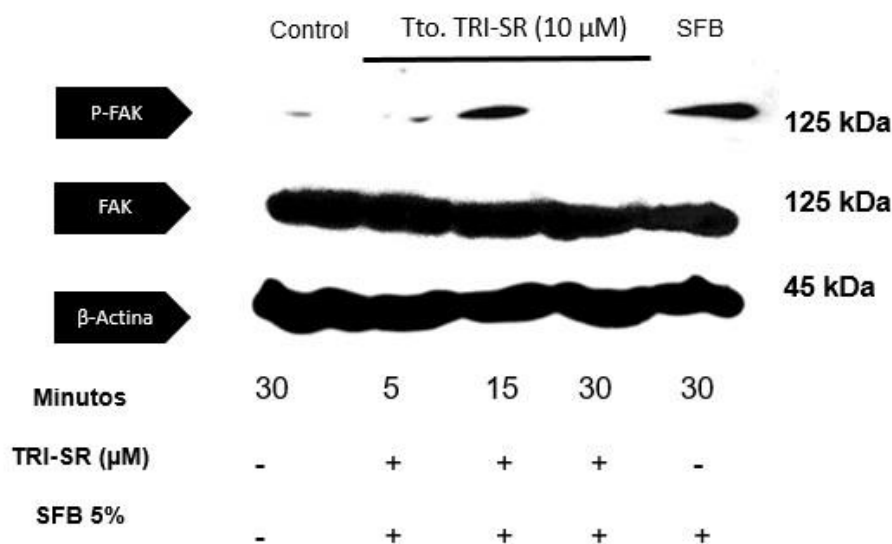
La vía de señalización FAK/Src está asociada a múltiples mecanismos relacionados con el desarrollo del cáncer, algunos de ellos son la migración y motilidad celular (78), como se ha mencionado previamente la migración celular fue un factor que también se evaluó dentro de la investigación, por lo tanto es importante dilucidar la regulación de la vía a través del uso de los triazaspiranos empleados y además establecer una asociación entre la actividad de la vía de señalización FAK/Src y el fenómeno de migración celular.

5.6.1 Western blot p-FAK: TRI-SR

El análisis de expresión proteica de la Figura 26 panel A muestra el efecto inhibitorio que la molécula TRI-SR ejerce sobre la expresión de la proteína p-FAK, esto realizado en un curso temporal de exposición a la molécula de 5, 15 y 30 minutos.

De forma interesante se observa inhibición en la expresión de p-FAK con respecto al grupo control de SFB, siendo el tiempo de 30 minutos el que presenta el mayor efecto de inhibición. En la Figura 26 panel B se observa el análisis estadístico representativo de tres estudios independientes, sobre la expresión de la proteína p-FAK, tras ser estimulada con la molécula TRI-SR, mostrando significancia estadística en las tres condiciones temporales empleadas (5, 15, y 30 minutos) en relación con el uso de SFB.

A



B

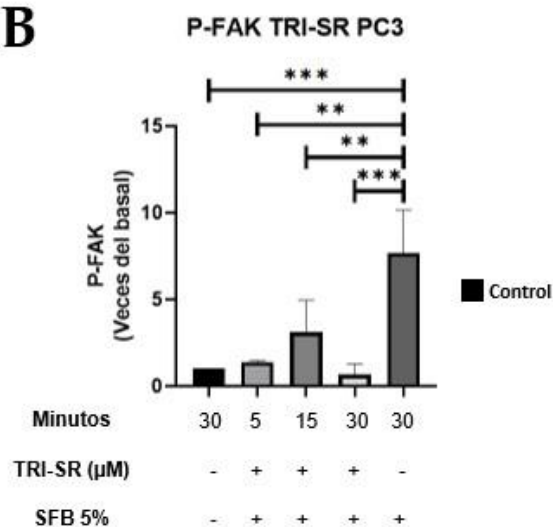
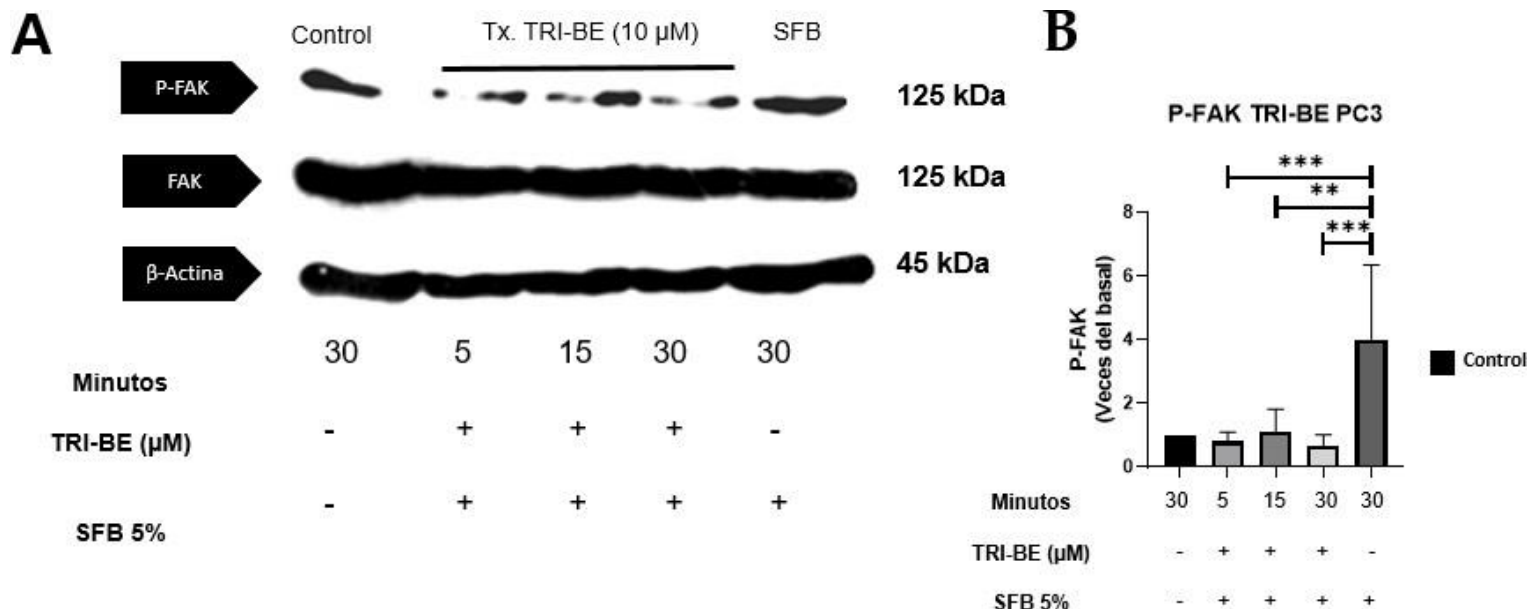


Figura 26. Determinación de la expresión de p-FAK: TRI-SR. Panel A) Curso temporal de 5, 15 y 30 minutos. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-SR (5 min) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRI-SR (15 min) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRI-SR (30 min) 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Min= Minutos. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRISR-5m 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRISR-15m 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5% (SFB); TRISR-30m 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL=Control SFB=Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.6.2 Western blot p-FAK: TRI-BE

El análisis de expresión proteica esquematizado en la Figura 27 panel A muestra el efecto inhibitorio del triazaspirano TRI-BE en la expresión proteica de p-FAK en células tumorales prostáticas PC3. Se puede apreciar que en las diversas condiciones de tiempo hay un efecto inhibitor, sin embargo, se encuentra que a los 30 minutos de exposición a la molécula el efecto es mayor. En la Figura 27 panel B se muestran los resultados del análisis estadístico, obtenido a partir de al menos tres ensayos independientes, encontrando que en las condiciones de 5 y 30 minutos hubo una mayor significancia estadística.



5.6.3 Western blot p-Src: TRI-SR

En el análisis de la expresión proteica de p-Src, se encontró que el TRI-SR (10 μ M) inhibió de forma significativa la expresión de p-Src en los distintos tiempos de exposición 5,15 y 30 minutos, esto se muestra en la Figura 28 panel A. La Figura 28 panel B muestra la diferencia significativamente estadística de al menos tres estudios independientes, lo que nos permite concretar que tras un estímulo con el trizaspirano, hay una mejora en la regulación de la vía FAK/Src.

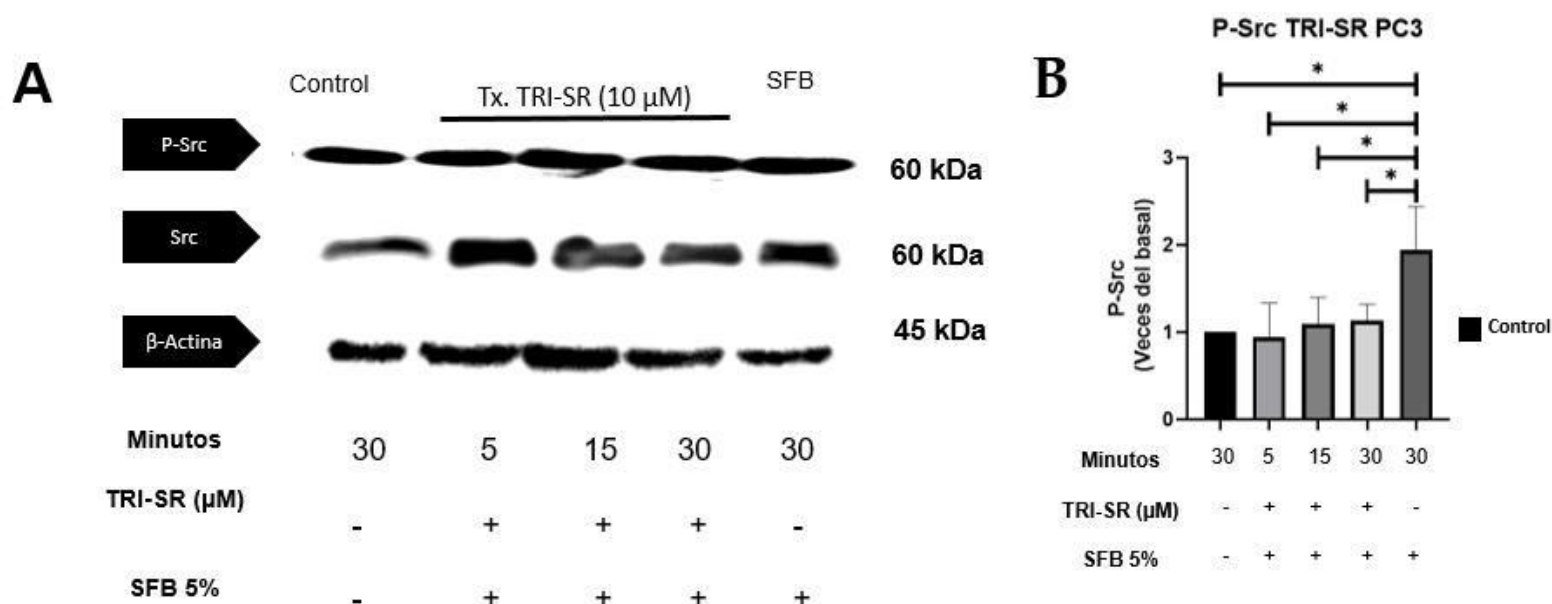


Figura 28. Determinación de expresión de p-Src: TRI-SR. Panel A) Curso temporal 5, 15 y 30 minutos. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-SR (5 min) 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRI-SR (15 min) 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5% (SFB); TRI-SR (30 min) 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Min= Minutos. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRISR-5m 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRISR-15m 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRISR-30m 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.6.4 Western blot p-Src: TRI-BE

En la Figura 29 panel A se muestra el efecto inhibitorio del TRI-BE sobre la expresión de la proteína p-Src, el cual es mayor dicho efecto a los 30 minutos de exposición. Los resultados que se muestran en la Figura 29 panel B corresponden a tres experimentos independientes.

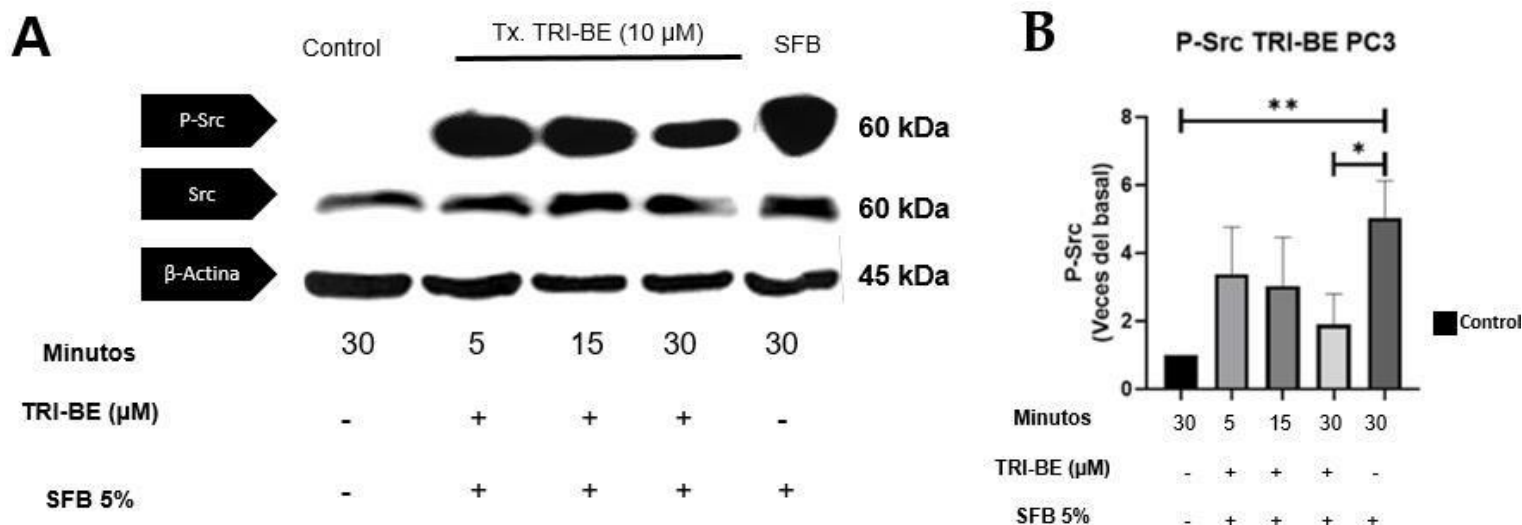


Figura 29. Determinación de expresión de p-Src: TRI-BE. Panel A) Curso temporal 5, 15 y 30 minutos. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM -TRI-BE (5 min) 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%-TRI-BE (15 min) 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5% (SFB)-TRI-BE (30 min) 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5% -(SFB) DMEM + SFB 5%. Min= Minutos. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-BE-5m 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRI-BE-15m 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; TRI-BE-30m 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL=Control, SFB=Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.7 Evaluación de la expresión proteica de E-cadherina y N-cadherina

Las cadherinas son proteínas que se les ha atribuido un valor importante como marcadores asociados al cáncer, principalmente relacionadas con la transición epitelio mesénquima responsable de factores promotores de la progresión tumoral (70), por lo tanto, cobra relevancia el análisis sobre estas proteínas, particularmente sobre la E-cadherina como marcador epitelial y N-cadherina denominada como marcador mesenquimal y vislumbrar el grado de expresión proteica tras la estimulación con la moléculas propuestas.

5.7.1 Western blot E-cadherina: TRI-SR

En la Figura 30 panel A se muestra el resultado de la expresión de E-cadherina tras el estímulo del triazaspirano en la línea celular tumoral PC3, donde a pesar de no encontrar una diferencia estadísticamente significativa en relación con el control positivo (SFB), en la Figura 30 panel B se muestra que existen una tendencia al incremento en la expresión de la proteína E-cadherina.

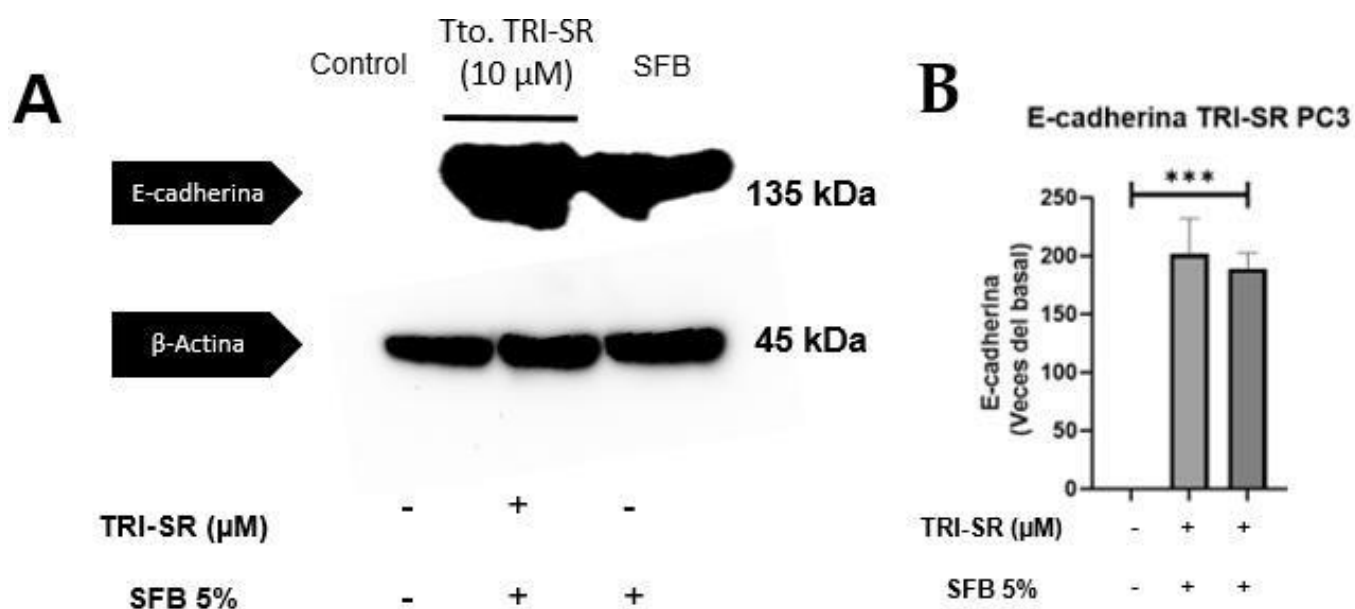


Figura 30. Determinación de expresión de E-cadherina: TRI-SR. Panel A) Curso temporal de 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-SR 10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-SR-10 μM 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.7.2 Western blot E-cadherina: TRI-BE

La Figura 31 panel A muestra que después de la adición del triazaspirano no hay cambios significativos en la expresión de E-cadherina, tras un curso temporal de exposición de 24 horas, en la Figura 31 panel B, tras el análisis estadístico de tres estudios independientes, se observó valores muy similares en ambas condiciones evaluadas TRI-BE y SFB.

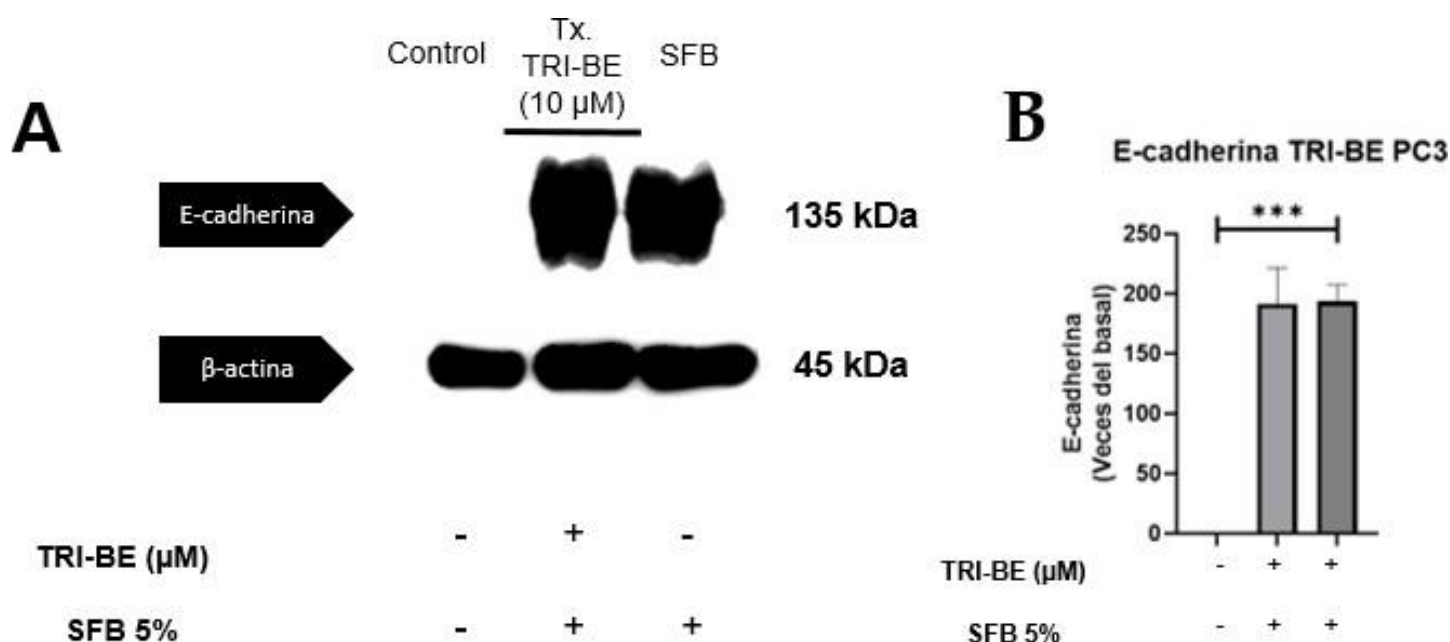


Figura 31. Determinación de expresión de E-cadherina: TRI-BE. Panel A) Curso temporal 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM -TRI-BE 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4- diona DMEM + SFB 5%-(SFB) DMEM + SFB 5%-(VEH) DMEM + Etanol 20%. VEH= Vehículo. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-BE-10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4- diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%; (VEH) DMEM + Etanol 20%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino, VEH= Vehículo. Los asteriscos denotan significancia estadística *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.7.3 Western blot N-cadherina: TRI-SR

En la Figura 32 panel A se puede observar que después de un estímulo con el TRI-SR (10 μ M), hay una tendencia al incremento en la expresión de N-cadherina, sin embargo, el análisis estadístico (Figura 32 panel B) de las condiciones empleadas no se mostró diferencias significativas entre las condiciones.

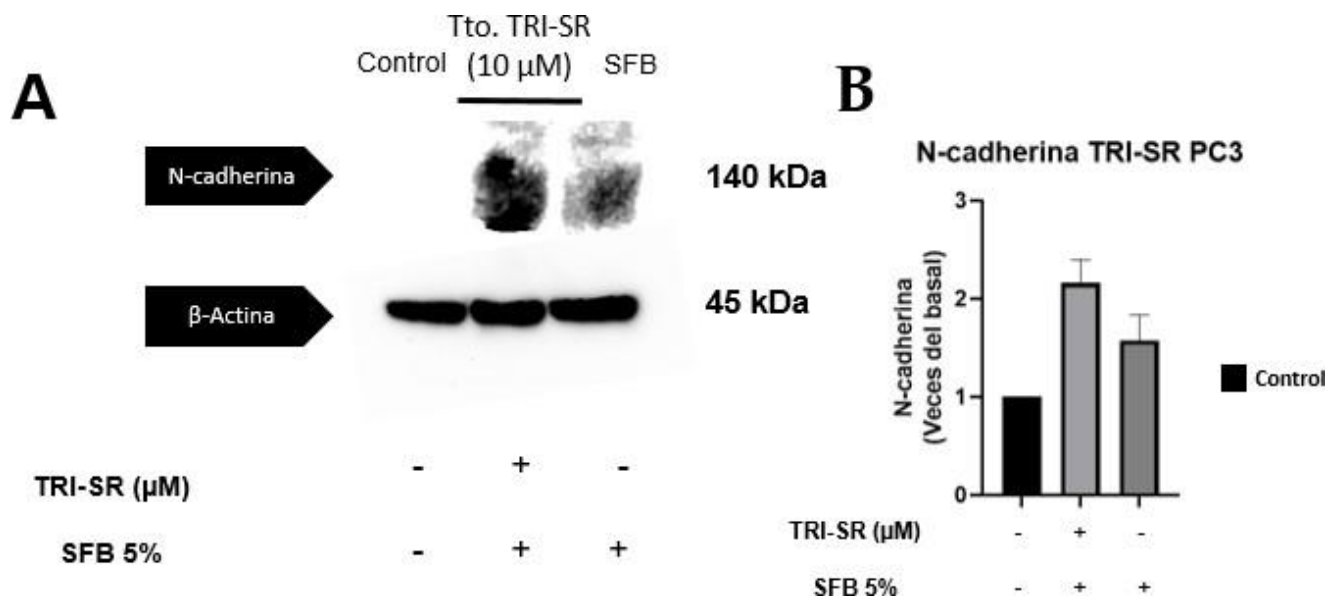


Figura 32. Determinación de expresión de N-cadherina: TRI-SR. Panel A) Curso temporal 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM -TRI-SR 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4- diona DMEM + SFB 5%-(SFB) DMEM + SFB 5%. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-SR 10 μ M 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

5.7.4 Western blot N-cadherina: TRI-BE

El resultado que se presenta en la Figura 33 panel A, muestra una tendencia a la supresión en la expresión de N-cadherina con el estímulo del triazaspirano, no obstante, en la Figura 33 panel B no se evidencian cambios estadísticamente significativos entre las condiciones comparadas.

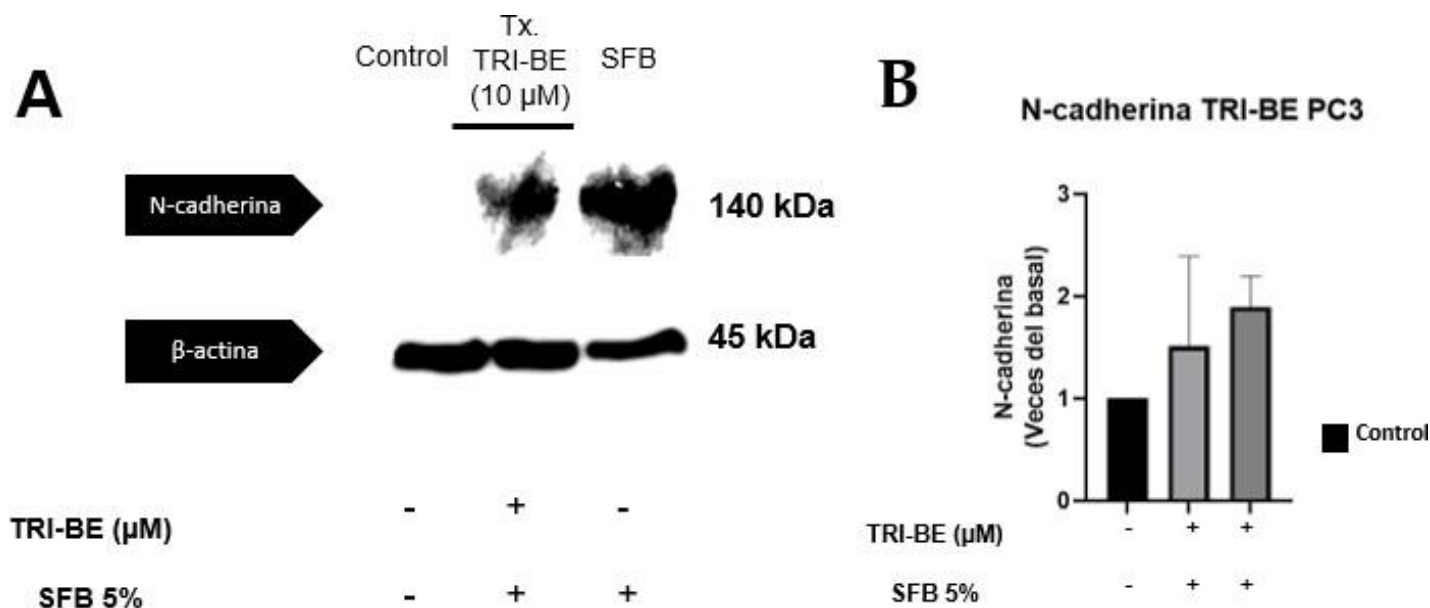


Figura 33. Evaluación de la expresión de N-cadherina: TRI-BE. Panel A) Curso temporal 24 horas. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-BE 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. Panel B) la gráfica representa $\pm$ D.E. de al menos tres experimentos independientes. Las condiciones son representadas de izquierda a derecha: (CTRL) DMEM; TRI-BE 10 μM 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona DMEM + SFB 5%; (SFB) DMEM + SFB 5%. CTRL= Control, SFB= Suero fetal bovino. Los asteriscos denotan significancia estadística * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, evaluado mediante una ANOVA de una vía.

6. DISCUSIÓN

En varones mexicanos el cáncer de próstata es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, mostrando el mayor número de casos de cáncer en varones en la población mexicana con un 29.9% (26,742 casos) (1). Esto resalta la importancia de generar alternativas que sugieran una oportunidad para mejorar la calidad y esperanza de vida del paciente con cáncer. En los últimos años se han elaborado y probado diversas moléculas con actividad anticancerígena, particularmente llama la atención la incursión de los compuestos espiro-heterocíclicos (92). Estas moléculas se han estudiado mostrando resultados favorables como agentes quimioterapéuticos en distintos tipos de cáncer, como en el caso de tumores de mieloma, mama y leucemia entre otros (92,100-102).

Los compuestos de tipo espiro son aquellos que tienen una estructura formada por dos anillos unidos ortogonalmente, estos compuestos suelen tener distintos componentes heterocíclicos logrando adquirir cierta similitud con algunas macromoléculas como proteínas, permitiéndoles obtener la capacidad de interaccionar de una forma más sencilla en sistemas biológicos (92).

Dentro de las estructuras cíclicas pertenecientes al TRI-SR y TRI-BE (compuestos de tipo espiro hidantoina), tenemos que la hidantoina es un compuesto usado para una amplia variedad de enfermedades siendo destacada su propiedad anticonvulsiva, antiinflamatoria y antitumoral entre otras (103).

Ante los hallazgos encontrados surge la idea de probar la efectividad de compuestos de tipo triazaspirano con estructura base de espiro hidantoína (1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona, 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona), para investigar su potencial efecto de regulación sobre los mecanismos de actividad biológica sobre células cancerosas y dilucidar su posible asociación con la vía de señalización FAK/Src implicada en el desarrollo del cáncer (66,67).

Otro de los aspectos importantes, en relación con los compuestos triazaspiranos, es el hecho de que han sido sujetos a las reglas de Lipinski, dicha regla de carácter

empírico permite conocer la posible solubilidad y permeabilidad de una molécula en un sistema biológico. Es aceptada de forma concluyente debido a que considera ciertas propiedades moleculares (tener un coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$) ≤ 5 , además de poseer un peso molecular ≤ 500 uma, no debe contener más de cinco donadores de enlaces por puentes de hidrógeno y no debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno) que tienen un impacto importante en la farmacocinética del ser humano. Ambas moléculas empleadas en la investigación fueron probadas mostrando el cumplimiento de estos criterios, manifestando una aprobación en ambos casos (104).

Fenómenos con la migración e invasión son aspectos íntimamente relacionados con el desarrollo tumoral, siendo factores imprescindibles para la generación de metástasis, a su vez, es considerada la mayor causa de muerte en los pacientes (76,105). Tras identificar a la migración e invasión como ejes fundamentales de la progresión tumoral, centralizamos la atención sobre la vía FAK/Src, misma que se encuentra relacionada con el fenómeno de motilidad celular (99). Por esto, la proteína FAK es de gran interés ya que se ha reportado una sobre activación en una gran variedad de tumores siendo considerada como un biomarcador de metástasis (106), además de estar asociada a distintas vías relacionadas a la supervivencia e invasión celular (107).

Por lo anterior, se seleccionaron a las proteínas FAK y Src para estudios de docking molecular, donde tras los análisis *in silico*, el docking nos mostró diversas interacciones entre la proteína FAK y los triazaspiranos evaluados, mostrando una afinidad importante de ambas moléculas por los residuos Y397, Y576 y Y577 que se localizan en el dominio cinasa. Es importante mencionar que dicha región es de suma importancia debido a que tras la interacción de diversos estímulos como los asociados a proteínas G, la proteína FAK se autofosforila en dicha región, lo que traen consigo el reclutamiento de Src, esto mediado por la alta afinidad a la región SH2 de la proteína Src, lo que genera la fosforilación de diversos sitios (Y576, Y577) en la proteína FAK, permitiendo que la proteína alcance su mayor capacidad catalítica (108). Por otro lado, en el análisis de docking de la proteína Src, se

encontró una afinidad considerable sobre la región de unión a FAK, la región SH2, por consiguiente, de acuerdo con las interacciones vistas en los estudios *in silico* nos permitió deducir un posible efecto inhibitorio ejercido sobre esta vía de señalización, permitiendo dar un punto de partida para los estudios de actividad biológica.

La capacidad migratoria e invasiva en las células tumorales es una de las mayores problemáticas, la sobreactivación de vías como la de FAK/Src, promueven fenómenos como los mediados por las proteínas GTPasas (Cdc42, Rac, RhoC), generando el reordenamiento del citoesqueleto celular mediante la formación de lamelopodios y la pérdida de interacciones célula-célula mediados por la proteína E-Cadherina, propiciando en la célula la adquisición de un fenotipo invasivo, a través de la transición epitelio mesénquima (TEM), lo que representa una característica importante para el desarrollo metastásico, lo que puede llegar a comprometer de forma seria la esperanza de vida del paciente (109,110). En los estudios que se realizaron de migración celular, se pudo observar que las moléculas de tipo triazaspirano inhiben la migración de forma estadísticamente significativa, lo que se corrobora con los estudios de Sulaiman et al. (14) y Mohan et al. (22), quienes en sus trabajos hacen uso de una molécula de tipo azaspirano denominada CIMO, siendo probada en células de hepatocarcinoma y cáncer de mama respectivamente. En los triazaspiranos estudiados en el presente trabajo se realizó una curva dosis respuesta que fue desde la concentración de 1 μ M hasta los 50 μ M, cabe mencionar que se encontraron resultados con tendencia favorable desde la concentración de 5 μ M similar a la dosis implementada en las dos investigaciones citadas previamente (14,22), no obstante se optó por seguir empleando la concentración de 10 μ M para los demás experimentos ya que en dicha dosis los resultados tuvieron significancia estadística, siendo el 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona el que mostró un mayor efecto a dicha concentración. Así mismo, en los ensayos de invasión celular, estudio indispensable para evaluar la evolución en la actividad celular de la enfermedad, esto debido a que el resultado es indicador de distintos fenómenos relacionados con la progresión tumoral, como es el caso de la migración celular aunada a la

capacidad aumentada de las células tumorales para segregar MMP'S, en nuestra investigación se encontraron efectos inhibitorios con el uso de ambas moléculas a la concentración de 10 μ M, esto contra nuestro control de SFB, esto también asociado con lo previamente reportado por Sulaiman et al. (14) y Mohan et al. (22). Otro factor determinante en el análisis de la progresión tumoral, tiene relación con lo descrito por Juárez et al. (111), donde mencionan que la sobreactivación de la vía FAK/Src trae consigo una mayor activación y secreción de MMP'S, la sobreexpresión se correlaciona con la proliferación e invasión celular además del incremento en el tamaño del tumor, en su trabajo se hace mención particularmente de las de tipo 2 y 9, siendo estas colagenasas, un factor determinante en el desarrollo de la invasión debido a la propiedad que tienen en la degradación de la membrana basal por su afinidad al colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, galectina-3 y fibronectina (111-114). El presente trabajo muestra una importante capacidad reguladora de la segregación de MMP'S, manifestando niveles considerablemente menores con significancia estadística en aquellas condiciones tratadas con ambos trizaspiranos estudiados (10 μ M), dicho hallazgo se considera importante en el manejo de la regresión del fenómeno TEM, ya que Niland et al. (115) consideran que la TEM está mediada por la actividad de las MMP'S, debido a la pérdida de la polaridad y adhesión celular. En la investigación realizada por Amit-Vazina et al. (19), emplearon el azaspirano Atiprimod donde encontraron que la concentración de 8 μ M inhibe la actividad de NF-kB, lo cual deja de manifiesto una importante asociación con nuestros hallazgos, esto debido a que la actividad de NF-kB está relacionado con la sobre expresión de MMP'S (116), lo que podría indicar que nuestras moléculas tengan un posible efecto regulatorio sobre dicha vía de señalización, propiciando una nueva perspectiva para futuras evaluaciones con las moléculas presentadas en esta investigación.

Tras la evidencia en favor de la inhibición de la actividad biológica en las células cancerígenas PC3, se procedió a la obtención de los ensayos de expresión proteica, esto con la finalidad de vislumbrar el posible mecanismo que explique este efecto inhibitorio. Se buscó particularmente la expresión de la forma fosforilada de las

proteínas implicadas en la vía FAK/Src, esto debido a que es la forma activa tras recibir su estímulo de activación (67,108). En la actualidad existen algunos compuestos que ya han sido probados con un potencial efecto inhibitor en la quinasa FAK, como lo es TAE-226 asociado a la inducción de apoptosis, PF562271, CEP-37440, además existen reportes de algunos inhibidores como lo son PF-271 y Y15, ambos compuestos siendo descritos con un mecanismo de acción dirigido al bloqueo del residuo de Y397 de FAK, permitiéndoles ser catalogados como bloqueadores de la tumorigénesis en cáncer de mama (117-120). En los datos obtenidos en este trabajo se aprecia un efecto inhibitorio a la concentración de 10 μ M de ambas moléculas en las células tumorales PC3, no obstante, el 1,3,8 triazaspiro [4.5] decano-2,4-diona mostró, tras un mayor tiempo de exposición, que ejerce una mayor disminución en la expresión de la proteína FAK fosforilada. Existe evidencia de inhibición en la proliferación de células de mieloma a través del uso de las moléculas de tipo azaspirano, específicamente el Atiprimod, mostrando una modulación a través del bloqueo de la fosforilación de proteínas clave como STAT3, mostrando una inhibición máxima a la concentración de 20 μ M, por otro lado en un estudio de igual forma se ve una disminución de la forma fosforilada de AKT, esto observado a diversas concentraciones que fueron de 0.5 a 5 μ M, en las vías de señalización de importancia en el desarrollo tumoral como lo son JAK-STAT3 y PI3K/ Akt (14,18,121). Por lo anterior descrito hay evidencia que nos permitiría tener un campo de acción sobre otras vías de señalización (JAK-STAT3 y PI3K/ Akt) para la prueba de los compuestos de tipo triazaspirano y su asociación como moléculas reguladoras de la progresión tumoral.

Complementando los hallazgos previamente descritos, Src es considerada como una proteína que sufre un incremento importante en su actividad catalítica en distintos tipos de cáncer invasivos, por lo cual, la inhibición de su actividad se considera importante para disminuir la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerígenas. Estudios preclínicos muestran algunos fármacos como el AZD0530 (tiene afinidad por el sitio de unión a ATP) el cual ha mostrado efectos importantes revirtiendo el fenotipo invasivo de células de cáncer de mama. Siendo Src una

proteína que participa en mecanismos de migración y motilidad, así mismo siendo reguladora de vías de supervivencia y proliferación celular, Src se convierte en un blanco trascendental para la regulación en células tumorales. El Vandetanib es un inhibidor de la familia de RET, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) y Src entre otras quinasas donde su actividad ha sido probada en carcinomas de tiroides (122-123). En los resultados del presente trabajo se puede observar que tras la exposición a los distintos triazaspiranos usados a una concentración de 10 μ M, hubo una disminución significativa en distintas condiciones de tiempo con las moléculas empleadas, encontrando que el 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona tuvo el mejor efecto inhibitorio al mayor tiempo de exposición, mostrando un efecto importante de supresión sobre los niveles de fosforilación de Src.

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores desencadenados por la sobreactivación de la vía de señalización FAK/Src, es la modificación de los contactos célula-célula, mediados por las cadherinas, estas son glicoproteínas transmembranales dependientes de calcio, vitales en el mantenimiento y forma de la estructura celular y tisular (124). Es conocido que las cadherinas han sido estudiadas con relación a distintos tipos de cáncer que van desde gástrico, prostático, de mama, entre otros (125). Resaltamos dos cadherinas de suma importancia, la N-Cadherina y E-Cadherina. La N-Cadherina considerada como un factor asociado a la progresión tumoral (incremento de migración y motilidad celular), entablando una relación con su expresión y el fenotipo de tipo invasivo o mesenquimal, al punto de ser considerada como un biomarcador de la transición epitelio mesenquimal. Por su parte, E-Cadherina, la que normalmente se expresa en el fenotipo epitelial, su pérdida de expresión en el ambiente celular condiciona a futura metástasis (126,127). Por otro lado, existe un fenómeno denominado “switch de cadherinas”, que consiste en la disminución de la E-Cadherina y el incremento de la N-Cadherina, en el desarrollo tumoral. El rol que juega la E-Cadherina es indispensable debido a que una pérdida de dicha proteína compromete de forma importante la estabilidad celular (128,129). En la investigación realizada se pudo

observar que las moléculas de tipo triazaspirano (10 μ M), sobre todo la molécula 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona marca una tendencia a mejorar la expresión de la E-Cadherina con respecto a la condición que dispone únicamente de SFB (condición que permite el crecimiento normal de las células tumorales). Por otro lado, en la evaluación sobre N-cadherina no se apreciaron cambios significativos, no obstante el triazaspirano 8-bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona mostro una tendencia interesante a suprimir la expresión de dicha proteína, tras los estudios realizados, se replantea el tiempo de exposición a la molécula, proponiendo tiempos que vayan de las 24 horas que fue lo planteado en esta investigación a un curso temporal de 48 horas, o en su defecto un incremento en las concentraciones del triazaspirano a utilizar realizando una curva dependiente de dosis respuesta.

Por lo anterior determinamos que las moléculas de tipo triazaspirano empleadas en la investigación, tienen importantes efectos inhibitorios sobre la actividad biológica de las células tumorales prostáticas PC3, esto demostrado en los ensayos de migración e invasión celular, aunado a esto, tras observar también un efecto de disminución en la segregación de MMPS, se puede hacer mención que las moléculas tiene un efecto importante en la disminución de la progresión de metástasis en las células tumorales PC3, el mecanismo de regulación que proponemos es descrito mediante la supresión de la vía de señalización FAK/Src, relacionada con múltiples efectos asociados a la progresión tumoral, como lo es la migración, invasión y angiogénesis, donde se pudo comprobar que los niveles de fosforilación de ambas proteínas de interés FAK y Src, se veían disminuidas en su forma fosforilada (activa), por lo tanto esto nos permite dilucidar qué ocurre una regulación negativa de la vía tras la interacción con las moléculas de tipo triazaspirano propuestas.

Vía de señalización FAK/Src

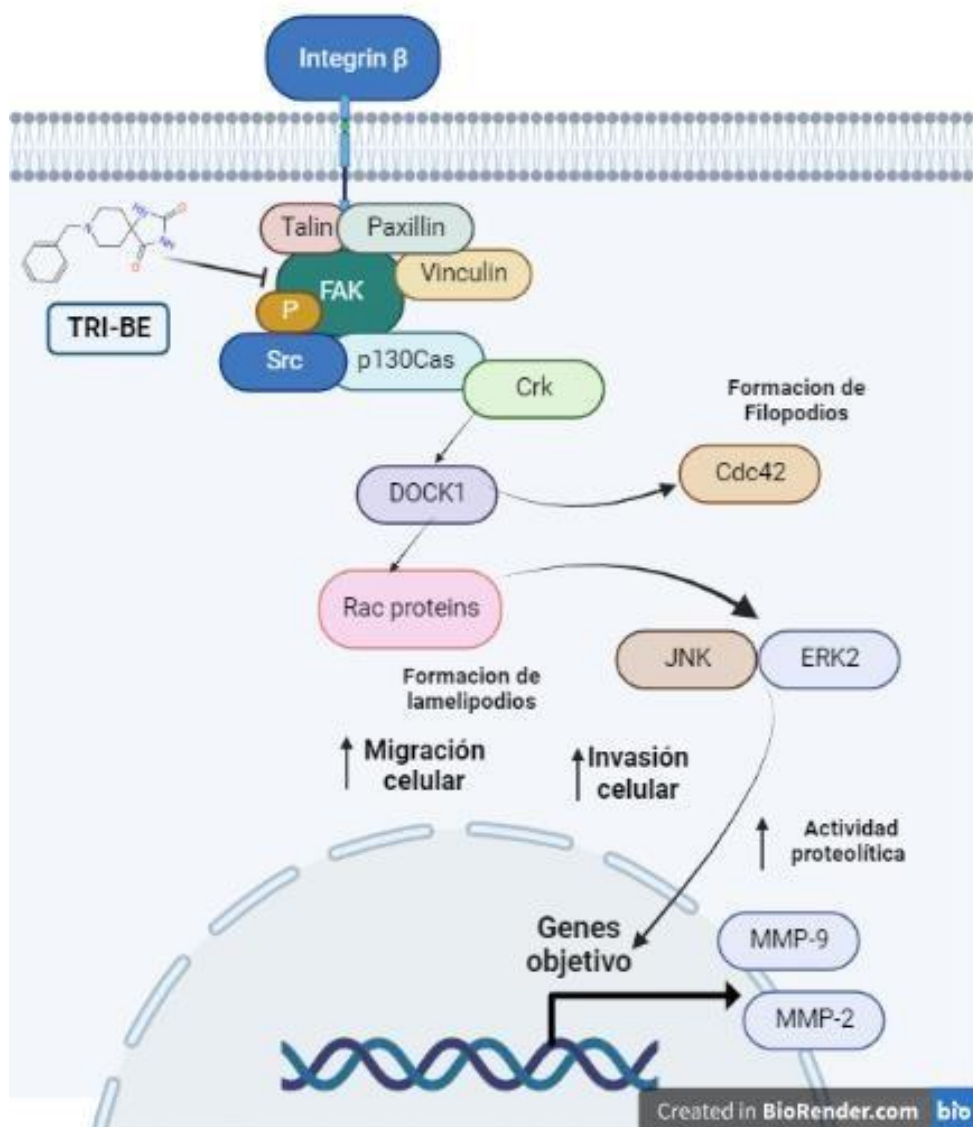


Figura 34. Vía de señalización FAK/Src.

7. CONCLUSIONES

Se determina que las moléculas de tipo triazaspirano 1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona y 8-Bencil-1,3,8 triazaspiro[4.5]decano-2,4-diona, tiene efecto inhibitorio sobre la migración celular en las células tumorales prostáticas PC3.

Los triazaspiranos en cuestión muestran un fenómeno de inhibición en la invasión celular en las células tumorales PC3.

Por otra parte, se encontró una disminución en la segregación de MMP-9 en las células PC3, tras la adición de los triazaspiranos empleados en el estudio.

Se observó una supresión de la expresión de las proteínas fosforiladas FAK y Src, luego de ser tratadas con los triazaspiranos.

Finalmente se crearon las bases para seguir estudiando el uso de los triazaspiranos como reguladores del fenómeno conocido como “switch de cadherinas”.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. mayo de 2021;71(3):209-49.
2. Moses C, Garcia-Bloj B, Harvey AR, Blancafort P. Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2018 Apr;93:10-8.
3. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med AAEM*. 2019 Mar 22;26(1):1-7.
4. Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*. 2018 Jun;14(6):e1007362.
5. Rani A, Dasgupta P, Murphy JJ. Prostate Cancer: The Role of Inflammation and Chemokines. *Am J Pathol*. 2019 Nov 1;189(11):2119-37.
6. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1863(6 Pt A):1238-60.
7. Bryan S, Masoud H, Weir HK, Woods R, Lockwood G, Smith L, Brierley J, Gospodarowicz M, Badets N. Cancer in Canada: Stage at diagnosis. *Health Rep [Internet]*. 2018 Dec 19 [cited 2022 Jun 1];29(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30566206/>
8. Saoud R, Heidar NA, Cimadamore A, Paner GP. Incorporating Prognostic Biomarkers into Risk Assessment Models and TNM Staging for Prostate Cancer. *Cells*. 2020 Sep 17;9(9):E2116.
9. Logothetis CJ, Gallick GE, Maity SN, Kim J, Aparicio A, Efstathiou E, et al. Molecular classification of prostate cancer progression: foundation for marker-driven treatment of prostate cancer. *Cancer Discov*. 2013 Aug;3(8):849-61.
10. Mulhem E, Fulbright N, Duncan N. Prostate Cancer Screening. *Am Fam Physician*. 2015 Oct 15;92(8):683-8.

11. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jun 1];18(1-2). Available from: <https://www.dl.begellhouse.com/journals/439f422d0783386a,3f85dd3739e1ad69,72fe0af97b0393c7.html>
12. Nevedomskaya E, Baumgart SJ, Haendler B. Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 2018 May;19(5):1359.
13. Brawley S, Mohan R, Nein CD. Localized Prostate Cancer: Treatment Options. *Am Fam Physician*. 2018 Jun 15;97(12):798-805.
14. Sulaiman NB, Mohan CD, Basappa S, Pandey V, Rangappa S, Bharathkumar H, Kumar AP, Lobie PE, Rangappa KS. An azaspirane derivative suppresses growth and induces apoptosis of ER-positive and ER-negative breast cancer cells through the modulation of JAK2/STAT3 signaling pathway. *Int J Oncol*. 2016; 49(3):1221-9.
15. Coker-Gurkan A, Can E, Sahin S, Obakan-Yerlikaya P, Arisan ED. Atiprimod triggered apoptotic cell death via acting on PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP and STAT3/NF-KB axis in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 breast cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2021 Jun;48(6):5233-5247. doi: 10.1007/s11033-021-06528-1. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34244887.
16. Griswold DE, Martin LD, Badger AM, Breton J, Chabot-Fletcher M. Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azaspiranes. *Inflamm Res*. 1998; 47(2):56-61.
17. Badger AM, Newman-Tarr TM, Satterfield JL. Selective immunomodulatory activity of SK&F 106615, a macrophage-targeting antiarthritic compound, on antibody and cellular responses in rats and mice. *Immunopharmacology*. 1997; 37(1):53-61.
18. Hamasaki M1, Hideshima T, Tassone P, Neri P, Ishitsuka K, Yasui H, Shiraishi N, Raje N, Kumar S, Picker DH, Jacob GS, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Azaspirane (N-N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. *Blood*. 2005; 105(11):4470-6.
19. Amit-Vazina M, Shishodia S, Harris D, Van Q, Wang M, Weber D, Alexanian R, Talpaz M, Aggarwal BB, Estrov Z. Atiprimod blocks STAT3

phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Cancer*. 2005; 93(1):70-80.

20. Faderl S, Ferrajoli A, Harris D, Van Q, Kantarjian HM, Estrov Z. Atiprimod blocks phosphorylation of JAK-STAT and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia (AML) cells. *Leuk Res*. 2007; 31(1):91-5.
21. Quintás-Cardama A, Manshouri T, Estrov Z, Harris D, Zhang Y, Gaikwad A, Kantarjian HM, Verstovsek S. Preclinical characterization of atiprimod, a novel JAK2 AND JAK3 inhibitor. *Invest New Drugs*. 2011; 29(5):818-26.
22. Mohan CD, Bharathkumar H, Bulusu KC, Pandey V, Rangappa S, Fuchs JE, Shanmugam MK, Dai X, Li F, Deivasigamani A, Hui KM, Kumar AP, Lobie PE, Bender A, Basappa, Sethi G, Rangappa KS. Development of a novel azaspirane that targets the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2014; 289(49):34296-307.
23. Xie F, Bergmann R, Kniess T, Deuther-Conrad W, Mamat C, Neuber Ch, Liu B, Steinbach J, Brust P, Pietzsch J, Jia H. 18F-Labeled 1,4-dioxa-8-azaspiro[4.5]decane derivative: synthesis and biological evaluation of a σ 1 receptor radioligand with low lipophilicity as potent tumor imaging agent. *J. Med. Chem*. 2015; 58(14):5395-5407.
24. Ma X, Chui WK. Antifolate and antiproliferative activity of 6,8,10-triazaspiro[4.5] deca-6,8-dienes and 1,3,5-triazaspiro[5.5]undeca-1,3-dienes. *Bioorg Med Chem*. 2010; 18(2):737-43.
25. Fleita DH, Sakka OK, Mohareb RM. Synthesis, structure activity relationships and biological activity evaluation of novel spirocyclic thiazolidin-4-ones as potential anti-breast cancer and epidermal growth factor receptor inhibitors. *Drug Res (Stuttg)*. 2014; 64(1):23-30.
26. Sierra MS, Soerjomataram I, Forman D. Prostate cancer burden in Central and South America. *Cancer Epidemiol* 2016, 44(Suppl 1):S131-S140.
27. Sabbatini P, Larson SM, Kremer A, Zhang ZF, Sun M, Yeung H, Imbriaco M, Horak I, Conolly M, Ding C, Ouyang P, Kelly WK, Scher HI. Prognostic significance of extent of disease in bone in patients with androgen-independent prostate cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17(3):948-957.
28. Weinfurt KP, Li Y, Castel LD, Saad F, Timbie JW, Glendenning GA, Schulman KA. The significance of skeletal-related events for the health-

related quality of life of patients with metastatic prostate cancer. *Ann Oncol* 2005, 16(4):579-584.

29. Cooper GM. The Development and Causes of Cancer. *Cell Mol Approach* 2nd Ed [Internet]. 2000 [citado 17 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
30. Parsa N. Environmental Factors Inducing Human Cancers. *Iran J Public Health*. 1 de noviembre de 2012;41(11):1-9.
31. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. enero de 2022;12(1):31-46.
32. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 15 de abril de 2019;144(8):1941-53.
33. Paul D. The systemic hallmarks of cancer. *J Cancer Metastasis Treat* [Internet]. 28 de agosto de 2020 [citado 13 de junio de 2022];2020. Disponible en: <https://jcmtjournal.com/article/view/3625>
34. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 17 de diciembre de 1998;396(6712):643-9.
35. Pon JR, Marra MA. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:25-50.
36. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. agosto de 2004;10(8):789-99.
37. Horsman MR, Vaupel P. Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2016;6:66.
38. Hawsawi YM, Zailaie SA, Oyouni AAA, Alzahrani OR, Alamer OM, Aljohani SAS. Prostate cancer and therapeutic challenges. *J Biol Res-Thessalon*. 10 de diciembre de 2020;27(1):20.
39. Smith y Tanagho *Urología General* 18ª Edición pdf | booksmedicos [Internet]. [citado 3 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://booksmedicos.org/tag/smith-y-tanagho-urologia-general-18a-edicion-pdf/>
40. Rebello RJ, Oing C, Knudsen KE, Loeb S, Johnson DC, Reiter RE, et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primer*. 4 de febrero de 2021;7(1):9.

41. Alizadeh M, Alizadeh S. Survey of Clinical and Pathological Characteristics and Outcomes of Patients With Prostate Cancer. *Glob J Health Sci.* diciembre de 2014;6(7):49-57.
42. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 12 de enero de 2018;8(12):a030361.
43. Cancer Statistics Review, 1975-2013 - Previous Version - SEER Cancer Statistics Review [Internet]. SEER. [citado 3 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/index.html
44. Barry MJ, Simmons LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am.* julio de 2017;101(4):787-806.
45. Culp MB, Soerjomataram I, Efstathiou JA, Bray F, Jemal A. Recent Global Patterns in Prostate Cancer Incidence and Mortality Rates. *Eur Urol.* enero de 2020;77(1):38-52.
46. Frankel S, Smith GD, Donovan J, Neal D. Screening for prostate cancer. *Lancet Lond Engl.* 29 de marzo de 2003;361(9363):1122-8
47. Borley N, Feneley MR. Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian J Androl.* enero de 2009;11(1):74-80.
48. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 6 de mayo de 2017;67(3):245-53.
49. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* enero de 1974;111(1):58-64.
50. Sebesta EM, Anderson CB. The Surgical Management of Prostate Cancer. *Semin Oncol.* octubre de 2017;44(5):347-57.
51. Chen FZ, Zhao XK. Prostate cancer: current treatment and prevention strategies. *Iran Red Crescent Med J.* abril de 2013;15(4):279-84.
52. Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Semin Nucl Med.* noviembre de 2016;46(6):484-90.

53. Onyango P. Genomics and cancer. *Curr Opin Oncol.* enero de 2002;14(1):79-85.
54. Sandhu S, Moore CM, Chiong E, Beltran H, Bristow RG, Williams SG. Prostate cancer. *Lancet Lond Engl.* 18 de septiembre de 2021;398(10305):1075-90.
55. Choi JD, Lee JS. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics Inform.* diciembre de 2013;11(4):164-73.
56. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 17 de mayo de 2001;411(6835):366-74.
57. Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, et al. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers.* 22 de octubre de 2019;11(10):E1618.
58. Yip HYK, Papa A. Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. *Cells.* 16 de marzo de 2021;10(3):659.
59. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 5 de abril de 2018;173(2):321-337.e10.
60. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2010;1802(4):396-405.
61. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem.* noviembre de 2003;253(1-2):269-85.
62. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin Cancer Biol.* diciembre de 2019;59:147-60.
63. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* septiembre de 2012;4(9):a011189.
64. Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, et al. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* diciembre de 2006;11(6):859-71.

65. Brunton VG, MacPherson IRJ, Frame MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochim Biophys Acta*. 5 de julio de 2004;1692(2-3):121-44.
66. Bolós V, Gasent JM, López-Tarruella S, Grande E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *OncoTargets Ther*. 24 de junio de 2010;3:83-97.
67. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol*. octubre de 2006;18(5):516-23.
68. Tilghman RW, Parsons JT. Focal Adhesion Kinase as a Regulator of Cell Tension in the Progression of Cancer. *Semin Cancer Biol*. febrero de 2008;18(1):45-52.
69. Läubli H, Borsig L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. *Front Immunol*. 6 de septiembre de 2019;10:2120.
70. Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci*. julio de 2003;94(7):575-81.
71. Sousa B, Pereira J, Paredes J. The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci*. 19 de abril de 2019;20(8):E1933.
72. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem*. 21 de febrero de 2020;295(8):2495-505.
73. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 1 de octubre de 2018;18(1):939.
74. Levin EG. Cancer therapy through control of cell migration. *Curr Cancer Drug Targets*. noviembre de 2005;5(7):505-18.
75. Novikov NM, Zolotaryova SY, Gautreau AM, Denisov EV. Mutational drivers of cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer*. enero de 2021;124(1):102-14.
76. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol*. octubre de 2005;17(5):559-64.
77. Haga RB, Ridley AJ. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*. 14 de septiembre de 2016;7(4):207-21.

78. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci.* agosto de 1999;112 (Pt 16):2677-91.
79. Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell.* 23 de noviembre de 2011;147(5):992-1009.
80. Menon S, Beningo KA. Cancer Cell Invasion Is Enhanced by Applied Mechanical Stimulation. *PLOS ONE.* 17 de febrero de 2011;6(2):e17277.
81. De Wever O, Mareel M. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* julio de 2003;200(4):429-47.
82. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther.* 12 de marzo de 2020;5(1):1-17.
83. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. agosto de 2000;36(13 Spec No):1621-30.
84. Stoletov K, Beatty PH, Lewis JD. Novel therapeutic targets for cancer metastasis. *Expert Rev Anticancer Ther.* febrero de 2020;20(2):97-109.
85. Zeeshan R, Mutahir Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci.* 20 de agosto de 2017;17(3):172-82.
86. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, Kurywchak PA, Levchenko A, Kalluri R, et al. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst.* 28 de agosto de 2019;9(2):109-27.
87. Wang T, Wu MB, Chen ZJ, Chen H, Lin JP, Yang LR. Fragment-based drug discovery and molecular docking in drug design. *Curr Pharm Biotechnol.* 2015;16(1):11-25.
88. Pinzi L, Rastelli G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 4 de septiembre de 2019;20(18):E4331.
89. Stanzione F, Giangreco I, Cole JC. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Prog Med Chem.* 2021;60:273-343.
90. Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Mol Basel Switz.* 22 de julio de 2015;20(7):13384-421.

91. Cho S, Kim SH, Shin D. Recent applications of hydantoin and thiohydantoin in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem.* 15 de febrero de 2019;164:517-45.
92. Ramdani LH, Talhi O, Taibi N, Delort L, Decombat C, Silva A, et al. Effects of Spiro-bisheterocycles on Proliferation and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* diciembre de 2016;36(12):6399-408.
93. Moujir LM, Seca AML, Araujo L, Silva AMS, Barreto MC. A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves. *Fitoterapia.* marzo de 2011;82(2):225-9.
94. Rivero, I.A.; Reynoso, E.A.; Ochoa-Teran, A. Microwave-assisted synthesis of cycloalkanespirohydantoins and piperidylspirohydantoins as precursors of restricted α -amino acids. *Arkivoc* 2011, 2011, 260-271.
95. García-González, V.; Mas-Oliva, J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 2019-2035.
96. Galindo-Hernandez O, Serna-Marquez N, Castillo-Sanchez R, Salazar EP. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* diciembre de 2014;91(6):299-310.
97. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics* [Internet]. 6th ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole; 2006 [citado 5 de septiembre de 2022]. 868 p. Disponible en: <http://catdir.loc.gov/catdir/enhancements/fy1514/2004117046-t.html>
98. Meng, X.Y.; Zhang, H.X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011, 7, 146-157.
99. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* enero de 2005;6(1):56-68.

100. Deen DF, Hoshino T, Williams ME, Nomura K, Bartle PM. Response of 9L tumor cells in vitro to spirohydantoin mustard. *Cancer Res.* noviembre de 1979;39(11):4336-40.
101. Deng J, Grande F, Neamati N. Small molecule inhibitors of Stat3 signaling pathway. *Curr Cancer Drug Targets.* febrero de 2007;7(1):91-107.
102. Kavitha CV, Nambiar M, Ananda Kumar CS, Choudhary B, Muniyappa K, Rangappa KS, et al. Novel derivatives of spirohydantoin induce growth inhibition followed by apoptosis in leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 1 de febrero de 2009;77(3):348-63.
103. Żesławska, E.; Kucwaj-Brysz, K.; Kincses, A.; Spengler, G.; Szymańska, E.; Czopek, A.; Marć, M.A.; Kaczor, A.; Nitek, W.; Domínguez-Álvarez, E.; et al. An insight into the structure of 5-spiro aromatic derivatives of imidazolidine-2,4-dione, a new group of very potent inhibitors of tumor multidrug resistance in T-lymphoma cells. *Bioorg. Chem.* 2021, 109, 104735.
104. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 de marzo de 2001;46(1-3):3-26.
105. Wu JS, Jiang J, Chen BJ, Wang K, Tang YL, Liang XH. Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Transl Oncol.* enero de 2021;14(1):100899.
106. Li S, Hua ZC. FAK expression regulation and therapeutic potential. *Adv Cancer Res.* 2008;101:45-61.
107. Zhou J, Yi Q, Tang L. The roles of nuclear focal adhesion kinase (FAK) on Cancer: a focused review. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 11 de junio de 2019;38(1):250.
108. Tapial Martínez P, López Navajas P, Lietha D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules.* 24 de enero de 2020;10(2):179.
109. Af van de M, G van der H, Jt B, G van der P. Protocols for Migration and Invasion Studies in Prostate Cancer. *Methods Mol Biol Clifton NJ [Internet].* 2018 [citado 7 de junio de 2022];1786. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29786787/>
110. Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae.* junio de 2015;7(2):17-28.

111. Juárez-Cruz JC, Zuñiga-Eulogio MD, Olea-Flores M, Castañeda-Saucedo E, Mendoza-Catalán MÁ, Ortuño-Pineda C, et al. Leptin induces cell migration and invasion in a FAK-Src-dependent manner in breast cancer cells. *Endocr Connect.* noviembre de 2019;8(11):1539-52.
112. Zhu J, Ren J, Tang L. Genistein inhibits invasion and migration of colon cancer cells by recovering WIF1 expression. *Mol Med Rep.* mayo de 2018;17(5):7265-73.
113. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis.* 1 de marzo de 2015;2(1):26-34.
114. Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* julio de 2015;44-46:184-90.
115. Niland S, Riscanevo AX, Eble JA. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* enero de 2022;23(1):146.
116. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res.* septiembre de 2014;2(9):823-30.
117. Pang XJ, Liu XJ, Liu Y, Liu WB, Li YR, Yu GX, et al. Drug Discovery Targeting Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Promising Cancer Therapy. *Molecules.* 13 de julio de 2021;26(14):4250.
118. Golubovskaya VM. Focal adhesion kinase as a cancer therapy target. *Anticancer Agents Med Chem.* diciembre de 2010;10(10):735-41.
119. Golubovskaya VM, Virnig C, Cance WG. TAE226-induced apoptosis in breast cancer cells with overexpressed Src or EGFR. *Mol Carcinog.* marzo de 2008;47(3):222-34.
120. Roberts WG, Ung E, Whalen P, Cooper B, Hulford C, Autry C, et al. Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. *Cancer Res.* 15 de marzo de 2008;68(6):1935-44.
121. Choudhari SR, Khan MA, Harris G, Picker D, Jacob GS, Block T, et al. Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Mol Cancer Ther.* enero de 2007;6(1):112-21.

122. Wadhawan A, Smith C, Nicholson RI, Barrett-Lee P, Hiscox S. Src-mediated regulation of homotypic cell adhesion: implications for cancer progression and opportunities for therapeutic intervention. *Cancer Treat Rev.* mayo de 2011;37(3):234-41.
123. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res.* abril de 2015;94:9-25.
124. Yu W, Yang L, Li T, Zhang Y. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front Oncol.* 2019;9:989.
125. Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr Opin Cell Biol.* 1 de octubre de 1993;5(5):806-11.
126. Cao ZQ, Wang Z, Leng P. Aberrant N-cadherin expression in cancer. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* octubre de 2019;118:109320.
127. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol Biosyst.* agosto de 2008;4(8):835-50.
128. Cavallaro U, Schaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumour progression: is it all in a switch? *Cancer Lett.* 25 de febrero de 2002;176(2):123-8.
129. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. *Int J Mol Sci.* 15 de octubre de 2020;21(20):7624.

Universidad Autónoma de Baja California

Coordinación General de Posgrado e Investigación

Otorga la siguiente constancia a:

JAVIER DE JESUS VASCONCELOS ULLOA

Por su destacada participación con la ponencia oral:

EVALUACIÓN DE UN TRIAZASPIRANO COMO POSIBLE INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR, Y SU EFECTO EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN FAK/SRC EN CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES PROSTÁTICAS PC3

En el área de: **Medicina y Salud**



ATENTAMENTE:
"POR REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"
Mexicali, Baja California, a 30 de octubre de 2020
Coordinador general

DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ



Universidad Autónoma de Baja California

Coordinación General de Investigación y Posgrado

Otorga la siguiente constancia a:

JAVIER DE JESÚS VASCONCELOS ULLOA

Por obtener el primer lugar en exposición oral con la ponencia

EVALUACIÓN DE UN TRIAZASPIRANO COMO POSIBLE INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR, Y SU EFECTO EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN FAK/SRC EN CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES PROSTÁTICAS PC3

En el área de: **MEDICINA Y SALUD**



ATENTAMENTE:
"POR REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE"
Mexicali, Baja California, a 30 de octubre de 2020
Coordinador general

DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
COORDINACIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: **JAVIER DE JESÚS VASCONCELOS ULLOA**

**POR SU DESTACADA PARTICIPACIÓN Y GANADOR DEL 1ER. LUGAR EN EL CONCURSO
INSTITUCIONAL UABC-3MT 2021 MODALIDAD VIRTUAL (TU TESIS EN 3 MINUTOS)**

Mexicali, Baja California, a 13 de agosto del 2021
"Por la realización plena del hombre"


Dr. Juan Guillermo Vaca Rodríguez

Coordinador General de Investigación y Posgrado



El Consejo Mexicano de Estudios de Posgrado, COMPEPO
Otorga la presente

CONSTANCIA

Por su valiosa participación en el Concurso "Tesis en Tres Minutos (3MT)" a



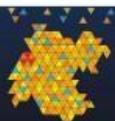
VASCONCELOS ULLOA JAVIER DE JESÚS

realizada en el marco del **34° Congreso Nacional de Posgrado 2021.**

León, Guanajuato, del 8 al 10 de septiembre de 2021.

Dr. Eduardo Gómez Ramírez
PRESIDENTE DEL
COMITÉ DIRECTIVO DE COMPEPO

Dr. Enrique Alejandro González Álvarez, fsc
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD
DE LA SALLE BAJÍO



El Consejo Mexicano de Estudios de Posgrado, COMEPO

Otorga la presente

CONSTANCIA

Por haber obtenido el SEGUNDO LUGAR en el
Concurso "Tesis en Tres Minutos (3MT)" a



VASCONCELOS ULLOA JAVIER DE JESÚS

realizada en el marco del **34° Congreso Nacional de Posgrado 2021**.

León, Guanajuato, del 8 al 10 de septiembre de 2021.

Dr. Eduardo Gómez Ramírez
PRESIDENTE DEL
COMITÉ DIRECTIVO DE COMEPO

Dr. Enrique Alejandro González Álvarez, fsc
RECTOR DE LA UNIVERSIDAD
DE LA SALLE BAJÍO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Coordinación General de Investigación y Posgrado

OTORGA LA SIGUIENTE CONSTANCIA A:

JAVIER DE JESUS VASCONCELOS ULLOA

Por su destacada participación con la ponencia oral:

EVALUACIÓN DE UN TRIAZASPIRANO COMO POSIBLE INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR, Y SU EFECTO EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN FAK/SRC EN CÉLULAS EPITELIALES TUMORALES PROSTÁTICAS PC3

En el área de: Medicina y Salud

Realizado el 28 y 29 Octubre de 2021


COORDINADOR GENERAL

DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Coordinación General de Investigación y Posgrado

OTORGA LA SIGUIENTE CONSTANCIA A:

VASCONCELOS ULLOA JAVIER DE JESUS

POR HABER OBTENIDO EL SEGUNDO LUGAR

EN EL ÁREA III: MEDICINA Y SALUD, NIVEL POSGRADO.

EN EL 8VO. ENCUENTRO ESTATAL DE JÓVENES INVESTIGADORES, REALIZADO EL 28 Y 29 DE OCTUBRE DE 2021.


COORDINADOR GENERAL

DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario del Sur
Secretaría Académica
Instituto de Investigaciones en Comportamiento
Alimentario y Nutrición
Instituto de Investigación de la Red Universitaria
Otorga la presente



CONSTANCIA

a:

Javier de Jesus Vasconcelos Ulloa

Por su participación como **PONENTE** con el proyecto titulado:

Evaluación de un triazaspirano como inhibidor de la migración e invasión de células tumorales prostáticas.

en el:

XIII COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN PARA ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS
Y EL V COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA

Atentamente

"Piensa y Trabaja"

Ciudad Guzmán, Municipio de Zapotlán el Grande, Jalisco a 06 de diciembre de 2021.

Dra. Elia Herminia Valdés Miramontes

Secretaria del Instituto de Investigaciones en Comportamiento
Alimentario y Nutrición

Dr. Andrés Valdez Zepeda

Secretario Académico

Dra. Zyanya Reyes Castillo

Directora del Instituto de Investigaciones en
Comportamiento Alimentario y Nutrición



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario del Sur
Secretaría Académica
Instituto de Investigaciones en Comportamiento Alimentario y Nutrición
Instituto de Investigación de la Red Universitaria
Otorga la presente



CONSTANCIA

*Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa, Dr. Raúl Díaz Molina,
Dr. Octavio Galindo Hernández*

Por obtener **2do LUGAR** con el proyecto titulado:

***Evaluación de un triazaspirano como inhibidor de la migración e invasión de células tumorales
prostáticas.***

en el:

**XIII COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN PARA ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS
Y EL V COLOQUIO INTERNACIONAL DE INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA**

Atentamente

"Piensa y Trabaja"

Ciudad Guzmán, Municipio de Zapotlán el Grande, Jalisco a 05 de diciembre de 2021.

Dra. Elia Herminia Valdés Miramontes
Secretaria del Instituto de Investigaciones
en Comportamiento Alimentario y Nutrición

Dr. Andrés Valdez Zepeda
Secretario Académico

Dra. Zyanya Reyes Castillo
Directora del Instituto de Investigaciones en
Comportamiento Alimentario y Nutrición



Sociedad Mexicana de
Bioquímica A.C.



SACRAMENTO NO. 413
COL. INSURGENTES BORJA
DEL BENITO JUÁREZ
CP. 03100
CDMX
TEL. (55)56225742
WWW.SMB.ORG.MX
FACEBOOK:
facebook.com/RedSMB

MESA DIRECTIVA 2021-2023

PRESIDENTA

Dra. Teresa María Tamez Hernández
Sotomayor

VICEPRESIDENTE

Dr. Agustín Guzmán Hernández

SECRETARÍA TESORERA

Dra. Beatriz María Jaramila González Padilla

SUBSECRETARÍA TESORERA

Dra. María de Lourdes Ghert Carey

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Roberto Arriaga López
Dr. Edmundo Celis Cuatrecasas
Dr. Guillermo Cervantes Sandoval
Dr. Joaquín Cevallos
Dr. Carlos del Río Estrada
Dr. Silvestre Fariñas Franco
Dr. María García Hernández
Dr. Jesús Guzmán García
Dr. Jesús Kumala Rodríguez
Dr. José Laguarda García
Dr. Guillermo Masera Helguera
Dr. Raúl Ochoa Vidanes
Dr. Stefan G. Pardo Castro
Dr. Guillermo Soriano Acavado

Se otorga la presente

CONSTANCIA a:

Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Evaluation of two triazaspiranes as inhibitors of migration and
invasion in prostate cancer cells PC3**

Por: Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa, Octavio Galindo Hernández,
Ignacio Alfredo Rivero Espejel, Víctor Guadalupe García González,
Raúl Díaz Molina

En la modalidad de cartel durante el
XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica
16 - 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dra. Teresa Hernández Sotomayor
Presidenta



Universidad Autónoma de Baja California

Coordinación General de Investigación y Posgrado

Departamento de Apoyo a la Docencia y la Investigación

Campus Mexicali



Otorga la presente Constancia a:

VASCONCELOS ULLOA JAVIER DE JESUS

Por haber participado como PONENTE en el 10^{mo}. Foro de resultados de proyectos de investigación con el proyecto “Evaluación y análisis in silico de dos triazaspiranos como potenciales inhibidores de la migración e invasión de células tumorales prostáticas pc3” apoyado en la Convocatoria Especial de Apoyo a Necesidades Regionales 2020.

ATENTAMENTE

Mexicali, Baja California, 01 de diciembre de 2022

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER”


DRA. GISELA MONTERO ALPÍREZ
VICERRECTORA CAMPUS MEXICALI


DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRÍGUEZ
COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
Educación Medica Continua

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: M.C. Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa

Por su participación como **PONENTE** con el tema: **"Evaluación de la actividad de dos triazaspiranos como inhibidores de la migración e invasión en células tumorales prostáticas PC3"** en el **Seminario en "INVESTIGACIÓN EN NUTRICIÓN Y SALUD 2022"**, celebrado del 10 de marzo al 13 de diciembre del 2022, con un total de 25 horas, que amparan 3 créditos, con número de registro 2022-2-5058.

Mexicali, Baja California a 13 de diciembre del 2022.
"POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL SER"

DR. JOSÉ MANUEL AVENDAÑO REYES
DIRECTOR

DRA. GLADYS ELOISA RAMÍREZ ROSALES
COORD. DE EXTENSIÓN Y VINCULACIÓN FACULTAD

Article

A Triazaspirane Derivative Inhibits Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells

Javier de Jesús Vasconcelos-Ulloa ^{1,2,3}, Víctor García-González ^{2,3}, Benjamín Valdez-Salas ¹, José Gustavo Vázquez-Jiménez ², Ignacio Rivero-Espejel ⁴, Raúl Díaz-Molina ^{2,3,*} and Octavio Galindo-Hernández ^{2,3,*}

¹ Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21100, Baja California, Mexico; javier.vasconcelos@uabc.edu.mx (J.d.J.V.-U.); berval@uabc.edu.mx (B.V.-S.)

² Facultad de Medicina Mexicali, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Baja California, Mexico; vgarcia62@uabc.edu.mx (V.G.-G.); gustavo.vazquez@uabc.edu.mx (J.G.V.-J.)

³ Laboratorio Multidisciplinario de Estudios Metabólicos y Cáncer, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali 21000, Baja California, Mexico

⁴ Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, Tijuana 22000, Baja California, Mexico; irivero@tectijuana.mx

* Correspondence: rauldiaz@uabc.edu.mx (R.D.-M.); octavio.galindo@uabc.edu.mx (O.G.-H.)

Abstract: Cancer is a serious health problem due to the complexity of establishing an effective treatment. The purpose of this work was to evaluate the activity of a triazaspirane as a migration and invasion inhibitor in PC3 prostatic tumor cells through a possible negative regulation of the FAK/Src signal transduction pathway and decreased secretion of metalloproteinases 2 and 9. Molecular docking analysis was performed using Moe 2008.10 software. Migration (wound-healing assay) and invasion (Boyden chamber assay) assays were performed. In addition, the Western blot technique was used to quantify protein expression, and the zymography technique was used to observe the secretion of metalloproteinases. Molecular docking showed interactions in regions of interest of the FAK and Src proteins. Moreover, the biological activity assays demonstrated an inhibitory effect on cell migration and invasion, an important suppression of metalloproteinase secretion, and a decrease in the expression of p-FAK and p-Src proteins in treated PC3 cells. Triazaspirane-type molecules have important inhibitory effects on the mechanisms associated with metastasis in PC3 tumor cells.

Keywords: prostate cancer; PC3; triazaspirane; FAK; Src



Citation: Vasconcelos-Ulloa, J.d.J.; García-González, V.; Valdez-Salas, B.; Vázquez-Jiménez, J.G.; Rivero-Espejel, I.; Díaz-Molina, R.; Galindo-Hernández, O. A Triazaspirane Derivative Inhibits Migration and Invasion in PC3 Prostate Cancer Cells. *Molecules* **2023**, *28*, 4524. <https://doi.org/10.3390/molecules28114524>

Academic Editor: Rosanna Maccari

Received: 5 May 2023

Revised: 23 May 2023

Accepted: 29 May 2023

Published: 2 June 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Prostate cancer (PCa) is a global public health problem. In 2020, PCa had the fourth highest incidence, accounting for 7.3% of all cancers (1,414,259 reported cases) and the fifth highest mortality rate, accounting for 3.8% (375,304 deaths) of all cancers [1]. Cancer is considered a heterogeneous disease and is highly variable due to the constant change in its molecular characteristics.

Metastasis is a biological process in which tumor cells spread to other organs, with the main target organs being bone, lungs, liver, and the brain. In this phenomenon, tumor cells acquire the ability to migrate and invade nearby tissues, such as pelvic lymph nodes, and eventually spread to other organs. Metastasis is the leading cause of cancer death, resulting in up to 90% of deaths in patients with cancer [2]. PCa is usually treated using local surveillance and radiotherapy or radical prostatectomy; treatment choice is based on clinical status and prostate-specific antigen levels. When the disease is in advanced stages and has already invaded other tissues, androgen deprivation therapy by surgical or chemical castration becomes an option; however, relapses can occur within 18–36 months, suggesting resistance to treatment [3]. During prostate cancer treatment, patients may

develop urinary, sexual, or intestinal dysfunction, resulting in poor improvement in their quality of life [4]. Therefore, pharmacological alternatives should be developed to improve outcomes in patients with PCa. Azaspiran-type molecules are compounds that have been associated with various beneficial effects, including their immunoregulatory capacity in murine models with rheumatoid arthritis, decreasing the inflammatory response and resulting in an improvement in the preservation of bone integrity [5,6].

On the other hand, antitumor effects have been described in azaspiran-type molecules. In myeloma cells, N,N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro[4.5]decane-2-propanamine (atiprimod) exhibits antiproliferative and antiangiogenic properties. Atiprimod modulates these processes through activation of proapoptotic proteins such as caspase-3 and -8, inhibition of Akt and STAT3 phosphorylation, and decreased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-6 (IL-6) [7,8], coupled with a decrease in the protein expression levels of JAK2 and p-JAK2, negatively regulating the JAK-STAT pathway [9,10]. In line with this notion, the antiproliferative effect of a derivative of the type 1 oxa-3-azaspiro[5.5]undecane has been observed through the modulation of the JAK2/STAT3 pathway in hepatocellular carcinoma and breast cancer cells, regardless of estrogen receptor expression status [11,12]. Various studies have proposed new strategies for the improvement of the quality of life of patients with PCa. Sulaiman et al. [11] demonstrated that 2-(1-(4-(2-cyanophenyl)-1-benzyl-1H-indol-3-yl)-5-(4-methoxy-phenyl)-1-oxa-3-azaspiro[5.5]undecane (CIMO) suppresses colony formation and viability of MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells by inhibiting the overactivation of the STAT3 pathway, which is strongly related to the progression of different types of tumors. STAT3 has been associated with cancer cell growth, particularly in hepatocellular carcinoma, lymphoma, and multiple myeloma, in the Supplementary Figure S1. Some azaspiran-type molecules (Atiprimod and CIMO) are observed, in addition to the structure of the molecule TRI-BE. The aim of the present study was to evaluate the inhibitory effect of 8-benzyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (TRI-BE) on PC3 prostate cancer cells of a highly invasive and metastatic cell line, as well as migration and invasion.

This is an explanatory, experimental, quantitative, *in silico*, and *in vitro* study using the PC3 cell line. Our *in silico* data suggest that TRI-BE can interact with FAK and Src. Accordingly, TRI-BE induces a decrease in FAK and Src phosphorylation levels, accompanied by a decrease in MMP-9 secretion in PC3 cells. However, TRI-BE does not cause statistically significant changes in E-cadherin and N-cadherin expression. Finally, TRI-BE induces a decrease in tumor migration and invasion. In summary, our data show, for the first time, that TRI-BE can inhibit PC3 prostate tumor cell migration and invasion.

2. Results

2.1. Molecular Docking: TRI-BE vs. FAK

In the present work, we proposed to evaluate various phenomena associated with tumor progression, including cell migration and invasion, that are significantly related to the FAK/Src signaling pathway. Therefore, a series of molecular docking tests was performed between TRI-BE (the macromolecule) and FAK (the protein). The FAK structure was obtained from the Protein Data Bank: 1MP8 crystal structure of focal adhesion kinase (FAK) (PDB <https://doi.org/10.2210/pdb1MP8/pdb>). The results are shown in Table 1; the three highest-affinity interactions between the conformers obtained from triazaspirane with FAK can be observed. The highest-affinity value obtained an E-score of -7.7878 kcal/mol, the interaction of which is shown in Figure 1A; followed by the conformer, which exhibited an interaction with an E-score of -7.7637 kcal/mol (Figure 1B); and finally, the interaction with an E-score of -7.6901 kcal/mol corresponding to the interaction of a third conformer (Figure 1C).

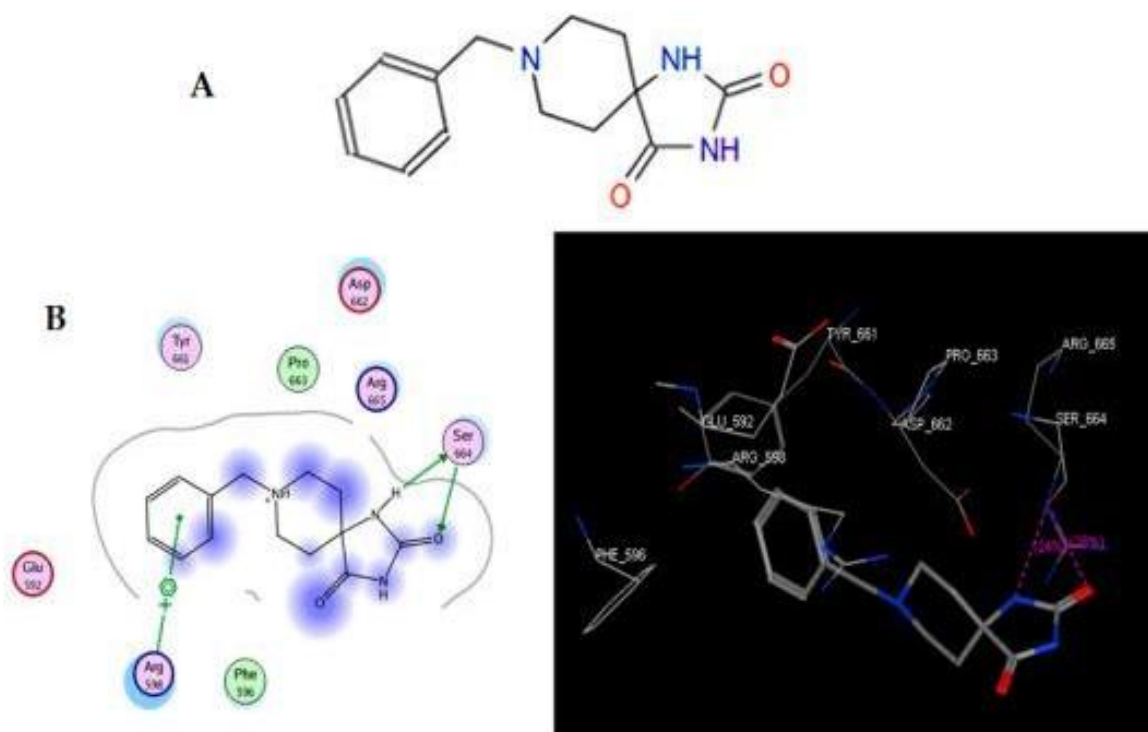


Figure 1. Cont.

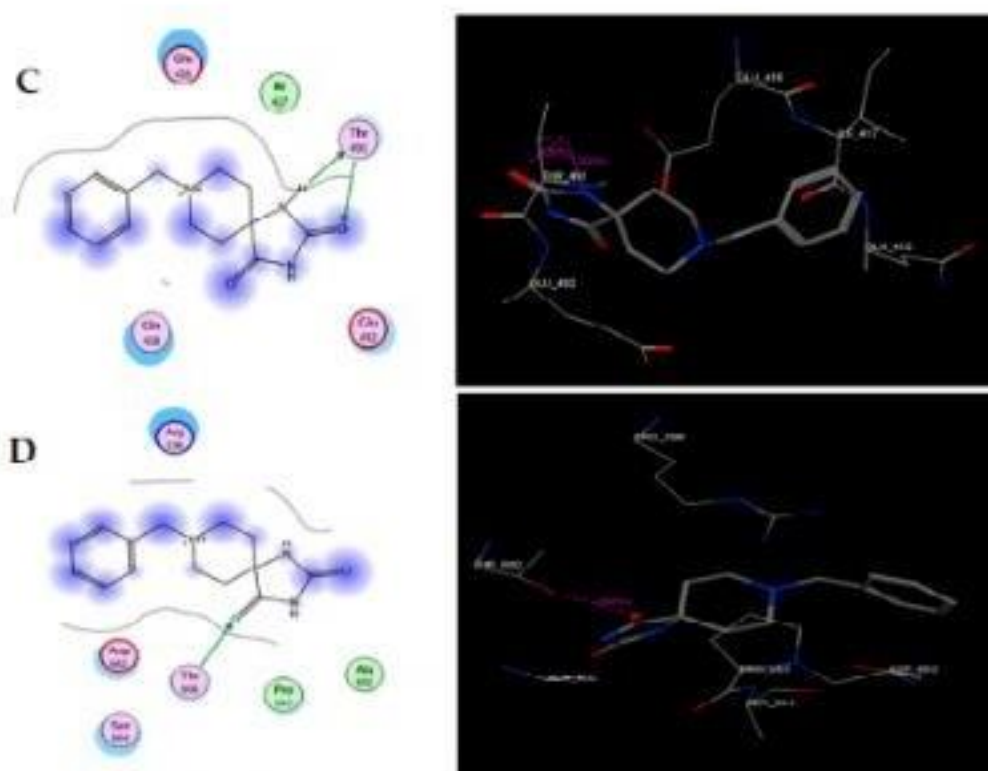


Figure 1. Structure of TRI-BE and molecular docking of TRI-BE and FAK. (A) Structure of TRI-BE in 2D. (B) The highest-affinity interaction (E-score: -7.7878 kcal/mol). (C) Mean affinity interaction (E-score: -7.7637 kcal/mol). (D) The lowest-affinity interaction (E-score: -7.6901 kcal/mol). The 2D and 3D structures are shown on the left and right, respectively.

Table 1. The highest-affinity E-score values obtained from molecular docking of TRI-BE and FAK.

Analysis	E-Score (kcal/mol)
FAK TRI-BE (A)	−7.7878
FAK TRI-BE (B)	−7.7637
FAK TRI-BE (C)	−7.6901

The most representative interactions of the different conformers obtained from the docking between TRI-BE and FAK (Figure 1) were as follows: a cation- π interaction between the TRI-BE and Arg 598 residue and a hydrogen bond interaction between the TRI-BE and Ser 664 (Figure 1A); a hydrogen bond interaction between the TRI-BE and the Thr 491 residue side chain (Figure 1B); and a hydrogen bond interaction between the TRI-BE and the Thr 600 side chain (Figure 1C).

2.2. Molecular Docking: TRI-BE vs. Src

To study the possible interaction between TRI-BE and Src using molecular docking, the Src structure was obtained from the PDB database. The 1FMK crystal structure of human tyrosine-protein kinase C-Src (PDB <https://doi.org/10.2210/pdb1FMK/pdb>) was selected as the protein. Table 2 shows the three most significant E-score results. Figure 2A shows the highest-affinity interaction (E-score: −8.2888 kcal/mol), Figure 2B shows the average E-score interaction (−7.9860 kcal/mol), and Figure 2C shows the lowest-affinity interaction (E-score: −7.8069 kcal/mol).

Table 2. The highest-affinity E-score values obtained from molecular docking of TRI-BE and Src.

Analysis	E-Score (kcal/mol)
Src TRI-BE (A)	−8.2888
Src TRI-BE (B)	−7.9860
Src TRI-BE (C)	−7.8069

The most representative interactions of the different conformers of TRI-BE and Src (Figure 2) were as follows: a hydrogen bond interaction between TRI-BE and residue Glu 147 residue and another hydrogen bond interaction with Tyr 90 residue side chain (Figure 2A); no direct interactions between TRI-BE and Src (Figure 2B); and a hydrogen bond interaction with the Glu 147 residue (Figure 2C).

The three conformers with the lowest binding energy were selected, as they are indicative of a higher degree of affinity to bind to the amino acids of a specific region of the FAK and Src proteins. These values are influenced by the interactions present in the coupling, such is the case of van der Waals, electrostatic, hydrogen bond, and hydrophobic interactions [13]. As shown by the interactions presented in Figure 3A, the coupling of TRI-BE with FAK, at least theoretically, has a great affinity for the region of the kinase domain, which is an important domain, since it generates the phosphorylation of target proteins downstream of FAK that lead to adhesion, spreading, migration, and metastasis. Moreover, catalytic site-binding proteins such as FIP200 have been shown to inhibit FAK activity [14].

On the other hand, in combination with the Src protein shown in Figure 3B, the selected TRI-BE conformers show higher affinity for the SH2 and SH3 domains, which are for interaction with proteins. In particular, the binding of TRI-BE to the SH2 domains in Src would block the recognition and interaction with the phosphorylated Y397 residue of FAK, suppressing the activation of the FAK/Src pathway [15] accompanied by a lower migratory and invasive capacity of cancer cells. This mechanism would explain the inhibitory effect of TRI-BE on the migration and invasion of PC3 cells.

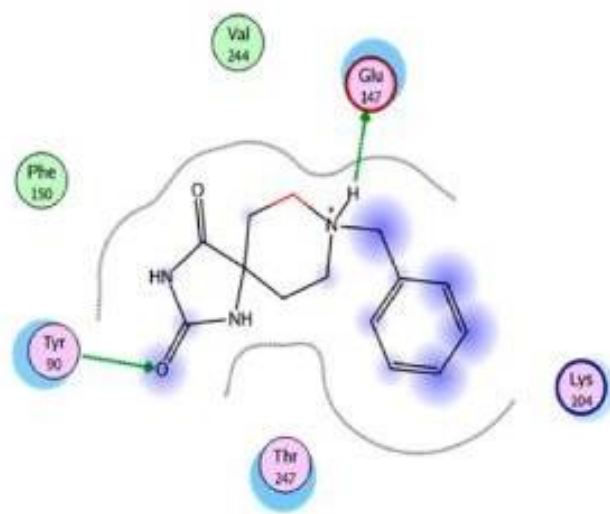
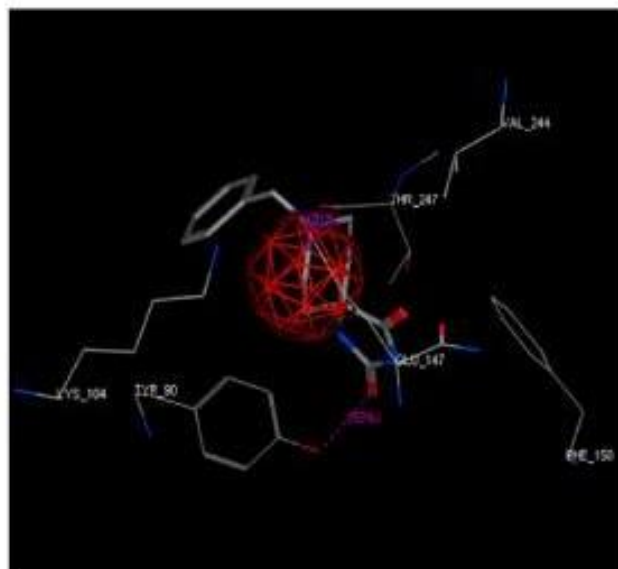
A

Figure 2. Cont.



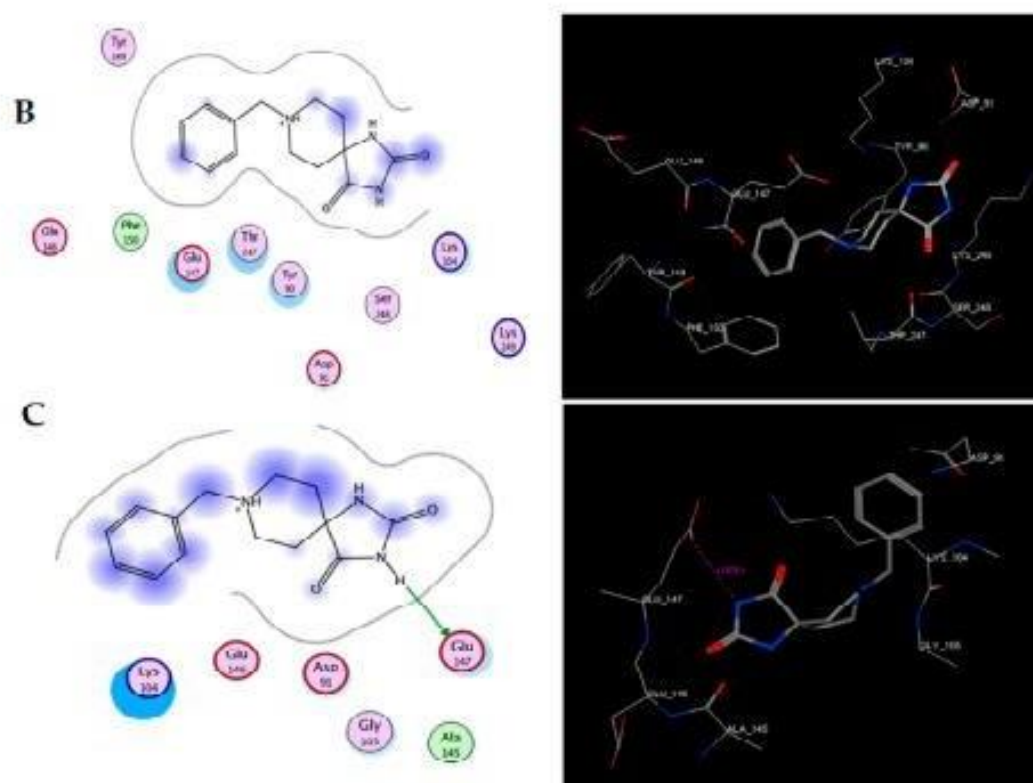


Figure 2. Molecular docking of TRI-BE and Src. (A) The highest-affinity interaction (E-score: -8.2888 kcal/mol). (B) Mean affinity interaction (E-score: -7.9860 kcal/mol). (C) The lowest-affinity interaction (E-score: -7.8069 kcal/mol). The 2D and 3D structures are shown on the left and right, respectively.

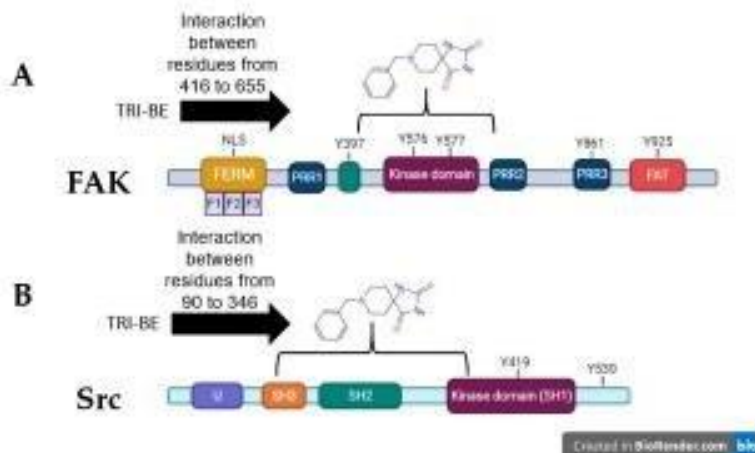


Figure 3. Theoretical interactions between TRI-BE and FAK (A) and Src (B) evaluated using molecular docking.

2.3. TRI-BE Inhibits PC3 Cell Migration

First, we evaluated the impact of TRI-BE on cell viability. Our data indicate that 10 μ M TRI-BE does not affect the viability of PC3 cells. We decided to study the effect of TRI-BE on PC3 cell migration using wound-healing assays. PC3 cells treated with TRI-BE showed a lower migratory capacity than control cells (Figure 4A) and exhibited the greatest inhibitory effect at 50 μ M.

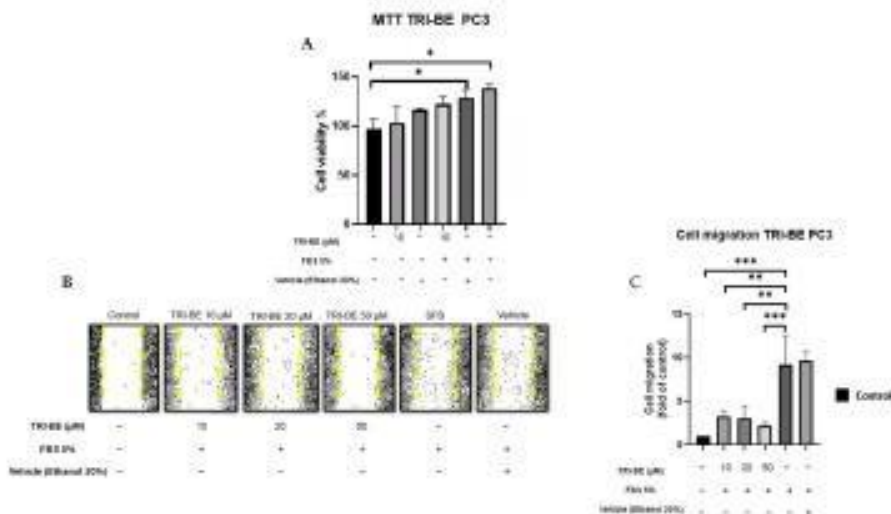


Figure 4. TRI-BE inhibits PC3 cell migration. (A) Cell viability was evaluated by MTT assay. (B) A 24 h time course. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; (TRI-BE 10 μ M) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (TRI-BE 20 μ M) 20 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (TRI-BE 50 μ M) 50 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%; (vehicle) DMEM + ethanol 20%. (C) The graph represents the means of each treatment $\pm$ SD of at least three independent experiments. CTRL = control, DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS = fetal bovine serum, SD = standard deviation. Asterisks indicate statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as assessed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's test.

2.4. TRI-BE Promotes a Decrease in the Invasive Capacity of PC3 Tumor Cells

The negative effect of TRI-BE on cell invasion was observed over a 24 h time course of stimulation (Figure 5A), suggesting that cell invasiveness was significantly inhibited upon application of TRI-BE compared to the positive control with 5% fetal bovine serum.

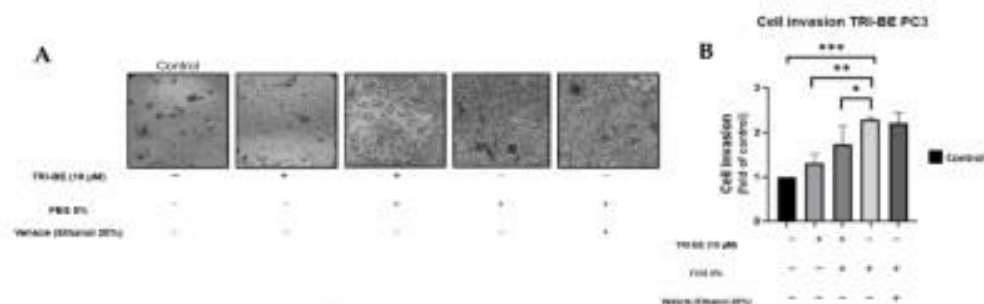


Figure 5. TRI-BE decreases the invasive capacity of PC3 cells. **(A)** A 24 h time course. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; (TRI-BE) 10 μ M TRI-BE + DMEM; (TRI-BE/FBS) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%; (Vehicle) DMEM + ethanol 20%. **(B)** The graph represents the means of each treatment $\pm$ SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, assessed using one-way ANOVA with Dunnett's test.

2.5. TRI-BE Induces a Decrease in MMP-9 Secretion

TRI-BE at a concentration of 10 μ M showed a remarkable suppressive effect on MMP-9 secretion (Figure 6A,B). TRI-BE reduced MMP-9 secretion by more than 50% (Figure 6B).

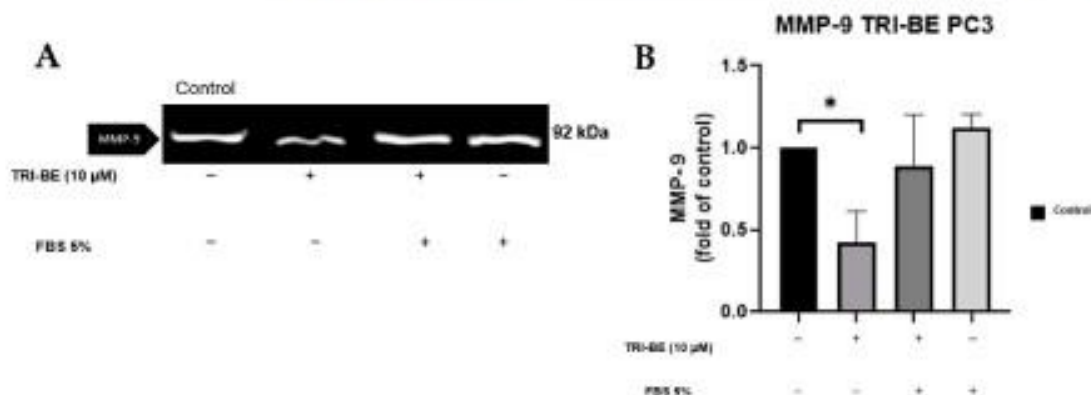


Figure 6. Effect of TRI-BE on MMP-9 secretion. **(A)** A 24 h time course. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; (TRI-BE) 10 μ M TRI-BE + DMEM; (TRI-BE/FBS) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%. **(B)** The graph represents the means of each treatment $\pm$ SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance; * $p < 0.05$, as assessed using one-way ANOVA with Dunnett's test.

2.6. TRI-BE Promotes a Decrease in Phosphorylation Levels of FAK and Src

We evaluated the effect of TRI-BE in regulating the activity of the FAK/Src signaling pathway and its impact on cell migration. As seen in Figure 7A, TRI-BE treatment induced a decrease in phosphorylated FAK (p-FAK) levels, with maximum inhibition at 5 min. Inhibitory effects were observed at the three time courses; however, TRI-BE had the greatest effect after 30 min of exposure.

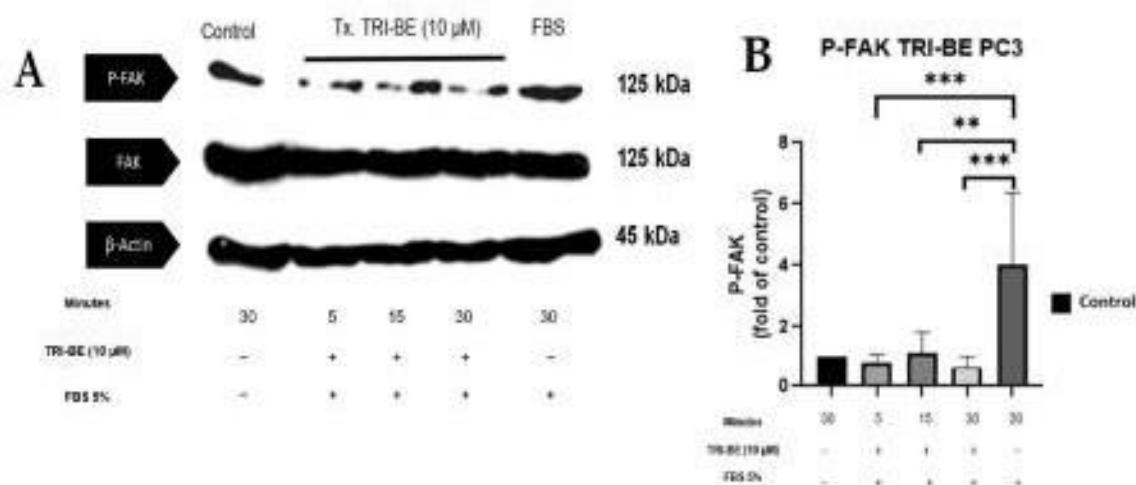


Figure 7. TRI-BE induces a decrease in phosphorylated FAK (p-FAK) levels. **(A)** Time courses of 5, 15, and 30 min. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; TRI-BE (5 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; TRI-BE (15 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5% (FBS); TRI-BE (30 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%. **(B)** The graph represents the means of each treatment $\pm$ S.D. of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as assessed using one-way ANOVA with Dunnett's test.

Figure 8A shows the inhibitory effect of TRI-BE on phosphorylated Src (p-Src) expression, which was highest after 30 min of exposure. The results shown in Figure 8B correspond to three independent experiments.

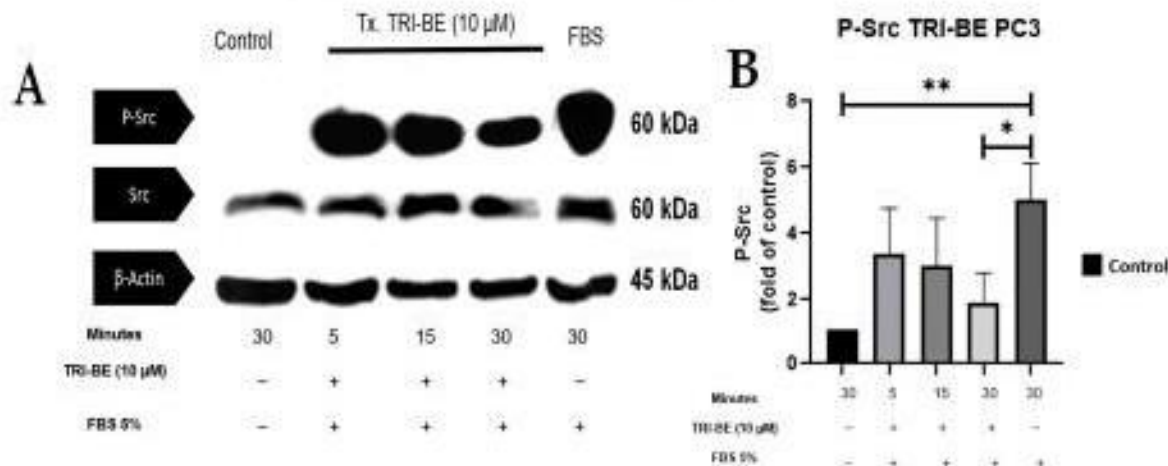


Figure 8. TRI-BE induces a decrease in p-Src levels in PC3 cells. **(A)** Temporary courses of 5, 15, and 30 min. Treatments are plotted from left to right: (CTRL) DMEM; TRI-BE (5 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; TRI-BE (15 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; TRI-BE (30 min) 10 μ M TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%. **(B)** The graph represents the means of each treatment $\pm$ SD of at least three independent experiments. Tx = treatment. Asterisks indicate statistical significance; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, as assessed using one-way ANOVA with Dunnett's test.

2.7. Evaluation of E- and N-Cadherin Expression

Figure 9A shows that there was no significant change in E-cadherin expression after the addition of TRI-BE after a 24 h time course of exposure. After statistical analysis of three independent studies, very similar values were observed in both evaluated treatments (Figure 9B, with and without TRI-BE and FBS).

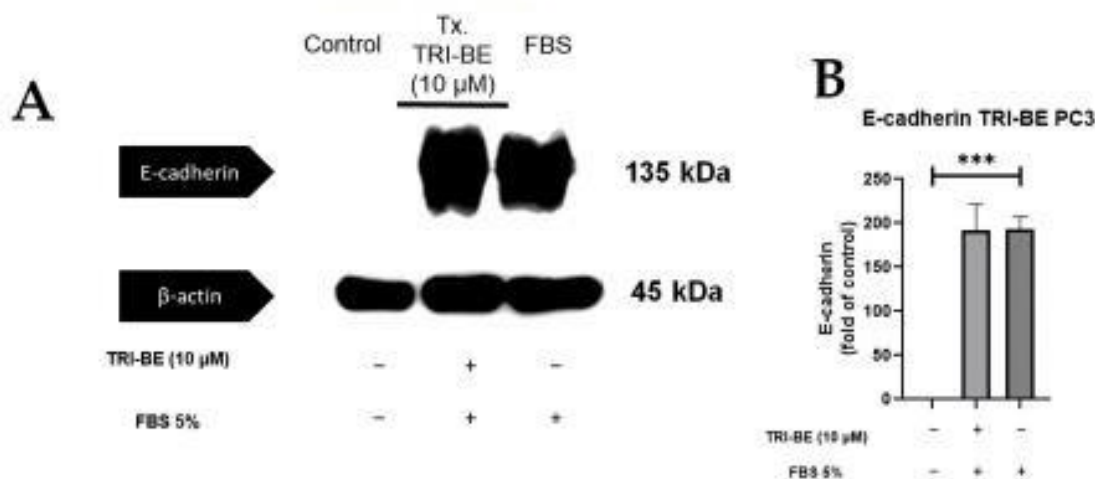


Figure 9. Effect of TRI-BE on E-cadherin expression levels. (A) A 24 h time course. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; TRI-BE 10 μM TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%. (B) The graph represents the means of each treatment ± SD of at least three independent experiments. Asterisks indicate statistical significance; *** $p < 0.001$, as assessed using one-way ANOVA with Dunnett's test.

TRI-BE tended to suppress N-cadherin expression (Figure 10A); however, no statistically significant changes were evident between the compared treatments (Figure 10B).

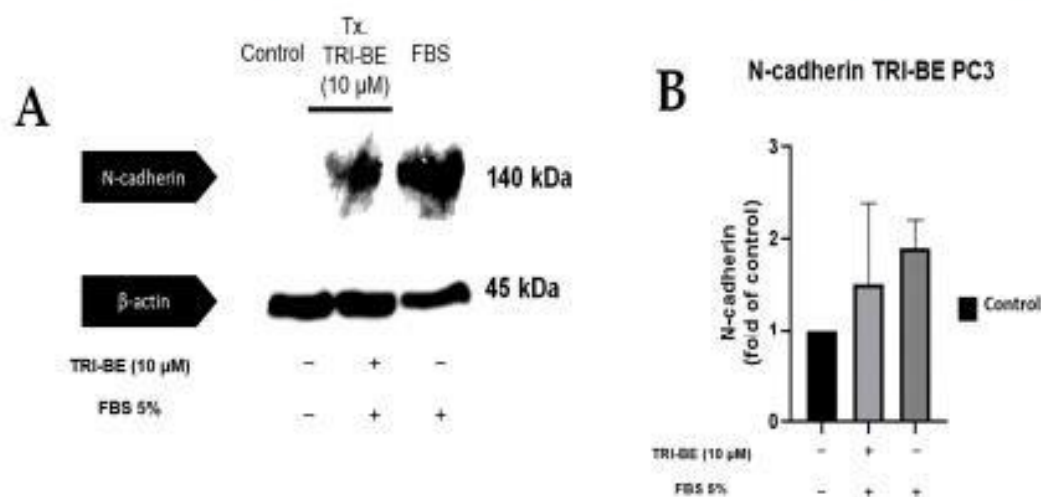


Figure 10. Effect of TRI-BE on N-cadherin expression levels. (A) A 24 h time course. Treatments are plotted from left to right: (control) DMEM; TRI-BE + DMEM + FBS 5%; (FBS) DMEM + FBS 5%. (B) The graph represents the means of each treatment ± SD of at least three independent experiments evaluated using one-way ANOVA with Dunnett's test.

3. Discussion

Prostate cancer is a major global health problem and is the most prevalent cancer in Mexican men, representing 29.9% of new cases of cancer in men (26,742 cases) in 2020 [1]. This highlights the need for diagnostic and therapeutic alternatives to improve the quality and life expectancy of patients with prostate cancer, especially in hormone-refractory tumors. One of the main problems faced by patients with advanced prostate cancer is resistance to androgen deprivation therapy (ADT), which is performed by surgical or chemical castration. However, even with ADT, the disease will progress to castration-resistant prostate cancer (CRPC). Approximately 90% of patients with CRPC develop bone metastases, which are related to mortality associated with the disease [16,17]. In recent years, a wide variety of molecules with anticancer activity has been developed and tested, particularly the use of spiro-heterocyclic compounds [18]. These molecules have been studied as antitumor agents, with favorable results in different types of cancer, such as myeloma, breast cancer, and acute myeloid leukemia [18–21]. Considering these findings, we propose determining the potential regulatory effect of triazaspirane derivatives with spiro-hydantoin-based structure (TRI-BE) on the mechanisms of biological activity in cancer cells and elucidating their possible association with the FAK/Src signaling pathway involved in the development of cancer [15,22].

Spiro-type compounds are those that have a structure formed by two orthogonally joined rings; these compounds usually have different heterocyclic components, managing to acquire a certain similarity with some macromolecules, such as proteins, allowing them to interact with proteins in complex biological systems [18].

In multiple cancer models, azaspirans and their derivatives have been tested as inhibitors of some tyrosine kinase proteins related to tumor progression, such as atiprimod (JAK2/JAK3 inhibitor) and lestaurtinib (JAK2 inhibitor), which present different tumor inhibition mechanisms [11,12].

In particular, the cyclic structure of TRI-BE is the spiro-hydantoin type, and hydantoin has been used for a wide variety of pathologies, most notably owing to its anticonvulsant, anti-inflammatory, and antitumor properties, among others [23].

An interesting aspect regarding compounds with potential biological activity is the evaluation of the application of Lipinski's rules, which empirically determine the potential solubility and permeability of a molecule in a biological system. Analysis of a molecular structure based on these rules is conclusively accepted because they are based on certain molecular properties, such as having an octanol/water partition coefficient ($\log P$) ≤ 5 , with a molecular weight ≤ 500 amu, containing no more than five hydrogen bridge donors and no more than ten bond hydrogen bridge acceptors. Lipinski's rules have a major impact on human pharmacokinetics. TRI-BE meets these aforementioned criteria, suggesting that it can be potentially used as a cancer drug, owing to its ability to diffuse in a biological system [24].

Cell migration and invasion are closely related to tumor development and are crucial factors in metastases, which, in turn, are considered the main cause of death in patients with cancer [25,26]. After identifying migration and invasion as fundamental processes in tumor progression, we focused on the FAK/Src pathway, which is related to cell motility [14]. FAK is of great interest since it has been reported to be overactivated in various tumors, is considered a biomarker for metastasis [27], and is associated with different pathways related to cell survival and invasion [28]. Therefore, FAK and Src were selected for molecular docking studies with TRI-BE. *In silico* analyses, docking showed various interactions between FAK and TRI-BE, suggesting that TRI-BE has an important affinity for Y397, Y576, and Y577 residues located in the kinase domain (Figure 3A). It is important to note that the kinase domain is highly relevant because it interacts with various stimuli, such as those associated with G proteins. It is also the region where FAK is autophosphorylated, leading to Src recruitment, which is mediated by high affinity to the SH2 region of the Src and results in the phosphorylation of various sites (Y576, Y577) in FAK, allowing the protein to reach its greatest catalytic capacity [29]. Furthermore, in the docking analysis of Src, a

considerable affinity to TRI-BE was observed in the FAK-binding region, the SH2 region (Figure 3B). Therefore, we can deduce a possible inhibitory effect exerted on this signaling pathway, which may serve as the basis for subsequent biological activity studies.

The migratory and invasive capacity of tumor cells is a major challenge in the field of oncology. Overactivation of pathways, such as FAK/Src, promote phenomena such as those mediated by GTPases (for example, Cdc42, Rac, and RhoC) and causes the rearrangement of the cellular cytoskeleton through the formation of lamellipodia and the loss of cell–cell interactions mediated by E-cadherin. This promotes the acquisition of an invasive phenotype in the cell through EMT, which represents an important characteristic for metastatic development, a phenomenon that seriously compromises the life expectancy of patients with cancer [30,31]. In the present work, cell migration studies confirmed that TRI-BE significantly inhibits PC3 cell migration. These results are comparable to those reported by Sulaiman et al. [11] and Mohan et al. [12], who found that azaspirane derivative CIMO had an inhibitory effect on hepatocarcinoma and breast cancer cell migration, respectively. In our study, a dose–response curve was constructed, with concentrations ranging from 1 to 50 μM , to evaluate the effect of TRI-BE on cell migration. It should be noted that our results showed a favorable trend from 5 μM , a dose similar to that used in the abovementioned studies [11,12]; however, 10 μM was used for subsequent experiments to achieve clear statistical significance. Likewise, in the cell invasion assays, an indispensable study to evaluate tumor progression, we found that TRI-BE at 10 μM had an inhibitory effect against our control FBS, also showing a relationship with the results reported by Sulaiman et al. [11] and Mohan et al. [12].

Another determining factor of tumor progression analysis is related to a study by Juárez et al. [32], who proposed that overactivation of the FAK/Src pathway leads to greater activation and secretion of MMPs, correlating with an increase in tumor proliferation and invasion. In their work, the authors mentioned that the collagenases MMP-2 and -9 are determining factors in the invasion process due to their ability to degrade the basement membrane of tumor cells, owing to their affinity for collagen types IV, V, VII, X, and XIV; gelatin; elastin; galectin-3; and fibronectin [32–35]. In the present study, an important regulatory capacity for MMP-9 segregation was demonstrated, with statistically significantly lower levels observed when treated with TRI-BE at 10 μM . This finding is important for EMT management; Niland et al. [36] determined that EMT was mediated by MMP activity due to loss of polarity and cell adhesion. Amit-Vazina et al. [8] used the azaspirane 2-(3-diethylaminopropyl)-8,8-dipropyl-2-azaspiro[4.5]decane-dimaleate (atiprimod) and found that it inhibited NF- κB activity in multiple myeloma cells at 8 μM . These results have important association with our findings because NF- κB activity is related to the overexpression of MMPs [37], which could indicate that TRI-BE has a possible regulatory effect on the FAK/Src signaling pathway; however, additional experiments are required to corroborate this hypothesis.

After confirming that the inhibition of PC3 cancer cell migration and invasion by TRI-BE, protein expression assays were performed to elucidate a possible mechanism that explains this inhibitory effect. The expression of the phosphorylated FAK and Src was evaluated, as they are the active forms associated with tumor progression [22,29]. Several compounds, such as TAE-226, which is associated with apoptosis induction; PF562271; and CEP-37440, have already been shown to inhibit FAK kinase. In addition, inhibitors such as PF-271 and Y15, the mechanism of action of which involves block FAK residue Y397, are considered potential blockers of tumorigenesis in breast cancer [38–41]. The results of this work indicate a suppressive effect of TRI-BE at 10 μM on the expression of p-FAK in PC3 tumor cells. Azaspirane-like molecules, specifically atiprimod, inhibit myeloma cell proliferation by modulation, which involves blocking the phosphorylation of key proteins, such as STAT3, with a maximum inhibition at 20 μM . Conversely, Choudhari et al. [42] noted a decrease in phosphorylated AKT (pS473-AKT) at concentrations of atiprimod ranging from 0.5 to 5 μM in other signaling pathways that determine tumor development, such as JAK-STAT3 and PI3K/Akt [7,11,42]. Taken together, it is worthwhile to evaluate

the effect of TRI-BE and other triazaspiranes on other signaling pathways (for example, JAK-STAT3 and PI3K/Akt) and establish their potential effect as molecules that regulate tumor progression.

Src is a protein whose catalytic activity significantly increases in different types of invasive cancer; therefore, inhibiting its activity is important to decrease the migratory and invasive capacity of cancer cells. Preclinical studies have shown that certain drugs, such as AZD0530 (which has an affinity for the ATP binding site in Src) and vandetanib (vascular endothelial growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor, and RET tyrosine kinases inhibitor) have important effects in reversing the invasive phenotype of breast cancer cells. Because Src participates in migration and motility mechanisms, as well as in the regulation of cell survival and proliferation pathways, it is a therapeutic target in tumor cell regulation [43,44]. The results of the present work show that exposure to TRI-BE at 10 μ M caused a significant decrease at different exposure times, with a greater inhibitory effect at the longest exposure time (30 min), inducing an important suppressive effect on Src phosphorylation levels.

As mentioned above, one of the factors triggered by the overactivation of the FAK/Src signaling pathway is the modification of cell–cell interactions mediated by cadherins, which are calcium-dependent transmembrane glycoproteins that are vital to the maintenance and shape of cell and tissue structure [45]. Cadherins have been studied in relation to different types of cancer, such as gastric, prostate, and breast cancers [46]. N-cadherin is associated with tumor progression (increase in cell migration and motility), establishing a relationship with its expression and the invasive or mesenchymal phenotype, to the point of being considered a biomarker of EMT. A significant decrease in E-cadherin expression, which is normally expressed in the epithelial phenotype, may affect metastasis [47,48]. Furthermore, cadherin switching involves decreases and increases in E- and N-cadherins, respectively, a phenomenon that is observed in tumor development. The role of E-cadherin is indispensable because a loss of this protein significantly compromises cell stability [49,50]. In this work, we observed that TRI-BE (10 μ M) had a marked tendency to improve E-cadherin expression in the treatment with only FBS (under normal conditions for tumor cell growth). Conversely, N-cadherin expression was not significantly affected; however, TRI-BE tended to suppress N-cadherin expression. New experiments should be conducted with the exposure time to TRI-BE increased to 48 h and its concentration increased using a dose–response curve ranging from 10 to 30 μ M.

Consequently, TRI-BE has important inhibitory effects on the biological activity of PC3 prostate tumor cells that were demonstrated in the migration and cell invasion assays, along with a decrease in MMP-9 segregation, which led to a decrease in the progression of metastasis in PC3 tumor cells. We propose a regulatory mechanism that involves the suppression of the FAK/Src signaling pathway, which is related to multiple factors associated with tumor progression, such as migration, invasion, and angiogenesis (Figure 11), verifying that the phosphorylation levels of both proteins of interest, FAK and Src, were lower in their phosphorylated (active) form. This elucidates that a negative regulation of the pathway occurred after the interaction with the triazaspirane-like molecule.

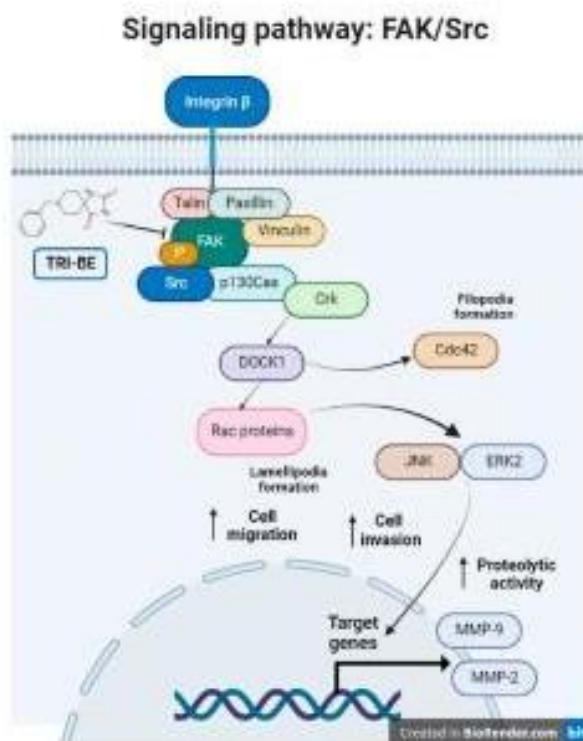


Figure 11. The FAK/Src signaling pathway. Association of the FAK/Src signaling pathway with various mechanisms involved in tumor progression (angiogenesis and cell migration and invasion). [from the figure filopodia formation].

4. Materials and Methods

4.1. Molecular Docking

Molecular docking analysis was performed using the Molecular Operating Environment (MOE) 2008.10 program (Chemical Computing Group Inc., Sherbrooke St. W, Montreal, QC, Canada). TRI-BE ligand design was performed using the Corina program (Molecular Networks GmbH Computerchemie, Nürnberg Germany). FAK and Src were obtained from the Protein Data Bank (PDB): 1MP8 crystal structure of focal adhesion kinase (FAK) (PDB <https://doi.org/10.2210/pdb1MP8/pdb>) and 1FMK crystal structure of human tyrosine-protein kinase C-Src (PDB <https://doi.org/10.2210/pdb1FMK/pdb>). The generation of the respective TRI-BE conformers to be evaluated was performed using Moe 2008.10. The proteins of interest, FAK and Src, were prepared for coupling using Moe 2008.10 by eliminating water molecules, protonating, and selecting the force field. Molecular coupling of TRI-BE with FAK or Src was performed by selecting the three highest-affinity E-Scores. The 2D and 3D images of the interaction site between the involved amino acids and the TRI-BE ligand were generated.

4.2. Compound Preparation

The TRI-BE molecule was synthesized at the Graduate and Research Center of the Technological Institute of Tijuana, Baja California, according to the methodology described by Rivero et al. [51]. Once the compound was obtained in its pure state, it was diluted in a 20% (v/v) ethanol solution (vehicle) to a concentration of 1 μ M (stock solution). Subsequently, the stock solution was used to stimulate the PC3 cell cultures at the concentrations indicated in the experiments.

4.3. Standardization of PC3 Cell Line Culture

The standardization of the PC3 prostate cancer cell line consisted of incubating the cultures in 100 mm diameter boxes with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 3.7 g/L sodium bicarbonate, 5% FBS, and antibiotic-antimycotic 100× (penicillin and streptomycin, Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in a humid atmosphere with 5% CO₂ and 95% oxygen at 37 °C.

4.4. MTT Assay

Cell viability was assessed by an MTT reduction assay under different conditions for 24 h. First, cells were seeded onto 96-well plates at a 150,000 cells/well density and allowed to grow at 90% of confluence. Next, the culture medium was replaced with an Opti-MEM medium. After 2 h under this condition, cells were treated in several experiments. Later, 30 µL of an MTT 2.1 mg/mL stock solution was added to the culture medium to obtain a final concentration of 0.5 mg/mL. Formazan crystals formed after 4 h of incubation were further dissolved by adding buffer lysis (20% sodium dodecyl sulfate, 50% *N,N*-dimethylformamide, pH 4.0) according to a previous report [52]. Finally, optical density was measured at 570 nm using a microplate reader.

4.5. Wound-Healing or "Scratch" Migration Test

PC3 cell cultures were stimulated with TRI-BE to assess their inhibitory capacity on cell migration using the wound-healing assay (also called "scratch" assay) as previously reported [53]. A PC3 cell culture with 100% confluence was suppressed with DMEM without FBS for 18 h and treated with mitomycin C for 2 h. After suppression, "scratching" or "wounding" was performed using the tip of a sterile 200 µL pipette; then, cultures were washed once with phosphate-buffered saline (PBS) 1× to remove suspended cells. The PC3 cells were then stimulated for 24 h with TRI-BE. After stimulation, the cells were fixed with cold methanol and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 in 10% acetic acid and 30% methanol (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and washed thrice with PBS 1X. Cell migration within the wound was photographed using a Vista Vision-VWR inverted microscope (Radnor, PA, USA) with a Moticam 5 coupled camera (Hong Kong).

4.6. Boyden's Chamber Invasion Assay

Invasion tests were performed in Boyden chambers using filters with 8 µm diameter pores [53]. PC3 cells were suppressed with FBS for 18 h. Matrigel BD (15 µL) and 45 µL of DMEM were placed in the inserts at the top of the chamber, then placed in the incubator for 30 min until the Matrigel BD and DMEM solidified. Subsequently, cell passaging was performed by placing 100 µL of cells per treatment on the solidified Matrigel in the Boyden chamber. A final volume of 600 µL of the corresponding DMEM, DMEM + FBS, and DMEM + FBS + TRI-BE treatments was placed at the bottom of the chamber. The cells were incubated under these treatment conditions for 24 h at 37 °C, after which the medium was aspirated from the compartments; the cells were fixed with cold methanol for 10 min, and cells that did not migrate were removed from the top of the chamber using a cotton swab. After performing this procedure, the cells at the bottom of the chamber were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 for 10 min. Membranes were washed thrice with double distilled water, and finally, the presence of cell invasion was identified by analyzing the Boyden chamber membrane using a Vista Vision-VWR inverted microscope with a Moticam 5 coupled chamber.

4.7. Immunodetection (Western Blotting)

PC3 cell cultures stimulated with TRI-BE were lysed for protein quantification using a BCA Pierce™ Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific™, USA) according to the manufacturer's instructions. These lysates were electrophoresed on acrylamide gels (30%, 29:1 acrylamide/Bis solution, BIO-RAD) with 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide

gel electrophoresis to separate the proteins, which were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane. The PVDF membranes were blocked with 5% milk for 2 h, then incubated overnight with the primary antibody diluted to 1:500 at 4 °C. The following antibodies were used: anti-p-FAK-Tyr397, anti-p-Src-Tyr418, anti-E-cadherin, anti-N-cadherin, anti- β -actin, total anti-FAK, and total anti-Src. After incubation, the membranes were washed thrice for 10 min with PBS 1× with 0.1% Tween, then incubated with species-specific secondary antibody (1:5000 dilution) after peroxidation for 2 h at 37 °C with shaking and washed thrice for 10 min with PBS 1× with 0.1% Tween, producing chemiluminescence. Autoradiographs were scanned, and the bands were quantified using ImageJ 1.52a (Bethesda, MD, USA).

4.8. Zymography

Confluent PC3 cell cultures were treated with TRI-BE (20% ethanol was used as the vehicle) and only FBS for the positive control. Conditioned (treated) media were collected and concentrated using Centricon centrifugal filters (Millipore) at 2500 rpm for 2 h. Equal volumes of concentrated conditioned medium were mixed with sample buffer (2.5% SDS, 1% sucrose, and 4 μ g/mL phenol red) without reducing agents and loaded onto 8% acrylamide gels (30%, 29:1 acrylamide/Bis solution, BIO-RAD) copolymerized with gelatin at 1 mg/mL. The gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 and incubated in activation buffer (50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) at 37 °C for 24 h. The gels were fixed and stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Proteolytic activity was detected with the presence of clear bands against the stained background of an undigested substrate. Gels were scanned, and bands were quantified using ImageJ 1.52a.

4.9. Statistical Analysis

Data were expressed as the mean of each experimental treatment $\pm$ standard deviation and subjected to one-way ANOVA with Dunnett's test. For differences between groups, a significance value (α) of $p < 0.05$ was used. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows (Boston, MA, USA) [54].

5. Conclusions

The molecule 8-benzyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione (TRI-BE) exhibited an inhibitory effect on PC3 prostate tumor cell migration and invasion. Furthermore, MMP-9 segregation decreased in PC3 cells. In addition to a suppression of the expression of phosphorylated FAK and Src after treatment with TRI-BE, which is related to the inhibitory effect of the molecule. This work provides a foundation for future studies on the use of triazaspiranes as regulators of "cadherin switching".

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/molecules28114524/s1>, Figure S1: Some azaspiran-type molecules (Atiprimod and CIMO) are observed, in addition to the structure of the molecule TRI-BE.

Author Contributions: Conceptualization, I.R.-E., R.D.-M. and O.G.-H.; Data curation, V.G.-G. and J.G.V.-J.; Formal analysis, O.G.-H.; Funding acquisition, R.D.-M.; Investigation, J.d.J.V.-U., R.D.-M. and O.G.-H.; Methodology, J.d.J.V.-U.; Project administration, O.G.-H.; Resources, I.R.-E. and R.D.-M.; Software, J.d.J.V.-U.; Supervision, B.V.-S., J.G.V.-J., R.D.-M. and O.G.-H.; Validation, V.G.-G.; Writing—original draft, J.d.J.V.-U. and O.G.-H.; Writing—review and editing, B.V.-S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the 22da Convocatoria Interna de Proyectos de Investigación (Internal Call for Research Projects, grant number 106/2/C/33/22) and Convocatoria Especial de Apoyo a Necesidades Regionales 2022 (Special Call to Support Regional Needs, grant number 106/2/C/157/7) from the Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data obtained throughout the experiments can be provided by O. G.H. upon reasonable request.

Acknowledgments: The first author thanks the National Council of Science and Technology (Conacyt) of Mexico for the PhD scholarship. We gratefully acknowledge the Universidad Autónoma de Baja California for the funding provided to carry out this project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compound TRI-BE (8-Benzyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione) are available from the authors.

Abbreviations

TRI-BE, 8-Benzyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione; FAK, focal adhesion kinase; CIMO, 2-(1-(4-(2-cyanophenyl)-1-benzyl-1H-indol-3-yl)-5-(4-methoxyphenyl)-1-oxa-3-azaspiro-(5,5)undecane; PVDF, polyvinylidene difluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; MOE, Molecular Operating Environment; PDB, Protein Data Bank; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; ECM, extracellular matrix.

References

- Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the Origin of Cancer Metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 43–73. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nevedomskaya, E.; Baumgart, S.J.; Haendler, B. Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Brawley, S.; Mohan, R.; Nein, C.D. Localized Prostate Cancer: Treatment Options. *Am. Fam. Physician* **2018**, *97*, 798–805.
- Griswold, D.E.; Martin, L.D.; Badger, A.M.; Breton, J.; Chabot-Fletcher, M. Evaluation of the cutaneous anti-inflammatory activity of azaspiranes. *Inflamm. Res.* **1998**, *47*, 56–61. [\[CrossRef\]](#)
- Badger, A.M.; Newman-Tarr, T.M.; Satterfield, J.L. Selective immunomodulatory activity of SK&F 106615, a macrophage-targeting antiarthritic compound, on antibody and cellular responses in rats and mice. *Immunopharmacology* **1997**, *37*, 53–61.
- Hamasaki, M.; Hideshima, T.; Tassone, P.; Neri, P.; Ishitsuka, K.; Yasui, H.; Shiraishi, N.; Raje, N.; Kumar, S.; Picker, D.H.; et al. Azaspirane (N,N-diethyl-8,8-dipropyl-2-azaspiro [4.5] decane-2-propanamine) inhibits human multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu in vitro and in vivo. *Blood* **2005**, *105*, 4470–4476. [\[CrossRef\]](#)
- Amit-Vazina, M.; Shishodia, S.; Harris, D.; Van, Q.; Wang, M.; Weber, D.; Alexanian, R.; Talpaz, M.; Aggarwal, B.B.; Estrov, Z. Atiprimod blocks STAT3 phosphorylation and induces apoptosis in multiple myeloma cells. *Br. J. Cancer* **2005**, *93*, 70–80. [\[CrossRef\]](#)
- Faderl, S.; Ferrajoli, A.; Harris, D.; Van, Q.; Kantarjian, H.M.; Estrov, Z. Atiprimod blocks phosphorylation of JAK-STAT and inhibits proliferation of acute myeloid leukemia (AML) cells. *Leuk. Res.* **2007**, *31*, 91–95. [\[CrossRef\]](#)
- Quintás-Cardama, A.; Manshouri, T.; Estrov, Z.; Harris, D.; Zhang, Y.; Gaikwad, A.; Kantarjian, H.M.; Verstovsek, S. Preclinical characterization of atiprimod, a novel JAK2 AND JAK3 inhibitor. *Investig. New Drugs* **2011**, *29*, 818–826. [\[CrossRef\]](#)
- Sulaiman, N.B.S.; Mohan, C.D.; Basappa, S.; Pandey, V.; Rangappa, S.; Bharathkumar, H.; Kumar, A.P.; Lobie, P.E.; Rangappa, K.S. An Azaspirane Derivative Suppresses Growth and Induces Apoptosis of ER-Positive and ER-Negative Breast Cancer Cells through the Modulation of JAK2/STAT3 Signaling Pathway. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 1221–1229. [\[CrossRef\]](#)
- Mohan, C.D.; Bharathkumar, H.; Bulusu, K.C.; Pandey, V.; Rangappa, S.; Fuchs, J.E.; Shanmugam, M.K.; Dai, X.; Li, F.; Deivasigamani, A.; et al. Development of a novel azaspirane that targets the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 34296–34307. [\[CrossRef\]](#)
- Meng, X.Y.; Zhang, H.X.; Mezei, M.; Cui, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* **2011**, *7*, 146–157. [\[CrossRef\]](#)
- Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2005**, *6*, 56–68. [\[CrossRef\]](#)
- Bolós, V.; Gasent, J.M.; López-Tarruella, S.; Grande, E. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *Oncotargets Ther.* **2010**, *3*, 83–97. [\[CrossRef\]](#)
- Sabbatini, P.; Larson, S.M.; Kremer, A.; Zhang, Z.F.; Sun, M.; Yeung, H.; Imbriaco, M.; Horak, I.; Conolly, M.; Ding, C.; et al. Prognostic Significance of Extent of Disease in Bone in Patients with Androgen-Independent Prostate Cancer. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 948–957. [\[CrossRef\]](#)

17. Weinfurt, K.P.; Li, Y.; Castel, L.D.; Saad, F.; Timbie, J.W.; Glendenning, G.A.; Schulman, K.A. The Significance of Skeletal-Related Events for the Health-Related Quality of Life of Patients with Metastatic Prostate Cancer. *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 579–584. [\[CrossRef\]](#)
18. Ramdani, L.H.; Talhi, O.; Taibi, N.; Delort, L.; Decombat, C.; Silva, A.; Bachari, K.; Vasson, M.P.; Caldefie-Chezet, F. Effects of Spiro-bisheterocycles on Proliferation and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Res.* **2016**, *36*, 6399–6408. [\[CrossRef\]](#)
19. Deen, D.F.; Hoshino, T.; Williams, M.E.; Nomura, K.; Bartle, P.M. Response of 9L Tumor Cells In Vitro to Spirohydantoin Mustard. *Cancer Res.* **1979**, *39*, 4336–4340.
20. Deng, J.; Grande, F.; Neamati, N. Small Molecule Inhibitors of Stat3 Signaling Pathway. *Curr. Cancer Drug Targets* **2007**, *7*, 91–107. [\[CrossRef\]](#)
21. Kavitha, C.V.; Nambiar, M.; Ananda Kumar, C.S.; Choudhary, B.; Muniyappa, K.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. Novel Derivatives of Spirohydantoin Induce Growth Inhibition Followed by Apoptosis in Leukemia Cells. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 348–363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Mitra, S.K.; Schlaepfer, D.D. Integrin-Regulated FAK-Src Signaling in Normal and Cancer Cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 516–523. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Zeslowska, E.; Kucwa-Brysz, K.; Kincses, A.; Spengler, G.; Szymalska, E.; Czopek, A.; Maré, M.A.; Kaczor, A.; Nitek, W.; Domínguez-Álvarez, E.; et al. An insight into the structure of 5-spiro aromatic derivatives of imidazolidine-2,4-dione, a new group of very potent inhibitors of tumor multidrug resistance in T-lymphoma cells. *Bioorg. Chem.* **2021**, *109*, 104735. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26. [\[CrossRef\]](#)
25. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46. [\[CrossRef\]](#)
26. Wu, J.-S.; Jiang, J.; Chen, B.-J.; Wang, K.; Tang, Y.-L.; Liang, X.-H. Plasticity of Cancer Cell Invasion: Patterns and Mechanisms. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 100899. [\[CrossRef\]](#)
27. Li, S.; Hua, Z.-C. FAK Expression Regulation and Therapeutic Potential. *Adv. Cancer Res.* **2008**, *101*, 45–61.
28. Zhou, J.; Yi, Q.; Tang, L. The Roles of Nuclear Focal Adhesion Kinase (FAK) on Cancer: A Focused Review. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **2019**, *38*, 250. [\[CrossRef\]](#)
29. Tapia Martínez, P.; López Navajas, P.; Lietha, D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. *Biomolecules* **2020**, *10*, 179. [\[CrossRef\]](#)
30. Van de Merbel, A.F.; van der Horst, G.; Buijs, J.T.; van der Pluijm, G. Protocols for Migration and Invasion Studies in Prostate Cancer. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1786*, 67–79.
31. Krakhmal, N.V.; Zavyalova, M.V.; Denisov, E.V.; Vtorushin, S.V.; Perelmuter, V.M. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Nat.* **2015**, *7*, 17–28. [\[CrossRef\]](#)
32. Juárez-Cruz, J.C.; Zuñiga-Eulogio, M.D.; Olea-Flores, M.; Castañeda-Saucedo, E.; Mendoza-Catalán, M.Á.; Ortuño-Pineda, C.; Moreno-Godínez, M.E.; Villegas-Comonfort, S.; Padilla-Benavides, T.; Navarro-Tito, N. Leptin Induces Cell Migration and Invasion in a FAK-Src-Dependent Manner in Breast Cancer Cells. *Endocr. Connect.* **2019**, *8*, 1539–1552. [\[CrossRef\]](#)
33. Zhu, J.; Ren, J.; Tang, L. Genistein Inhibits Invasion and Migration of Colon Cancer Cells by Recovering WIF1 Expression. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 7265–7273. [\[CrossRef\]](#)
34. Cathcart, J.; Pulkoski-Gross, A.; Cao, J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis.* **2015**, *2*, 26–34. [\[CrossRef\]](#)
35. Kessenbrock, K.; Wang, C.-Y.; Werb, Z. Matrix Metalloproteinases in Stem Cell Regulation and Cancer. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **2015**, *44–46*, 184–190. [\[CrossRef\]](#)
36. Niland, S.; Riscanevo, A.X.; Eble, J.A. Matrix Metalloproteinases Shape the Tumor Microenvironment in Cancer Progression. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Xia, Y.; Shen, S.; Verma, I.M. NF- κ B, an Active Player in Human Cancers. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 823–830. [\[CrossRef\]](#)
38. Pang, X.-J.; Liu, X.-J.; Liu, Y.; Liu, W.-B.; Li, Y.-R.; Yu, G.-X.; Tian, X.-Y.; Zhang, Y.-B.; Song, J.; Jin, C.-Y.; et al. Drug Discovery Targeting Focal Adhesion Kinase (FAK) as a Promising Cancer Therapy. *Molecules* **2021**, *26*, 4250. [\[CrossRef\]](#)
39. Golubovskaya, V.M. Focal Adhesion Kinase as a Cancer Therapy Target. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 735–741. [\[CrossRef\]](#)
40. Golubovskaya, V.M.; Vrmig, C.; Cance, W.G. TAE226-Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells with Overexpressed Src or EGFR. *Mol. Carcinog.* **2008**, *47*, 222–234. [\[CrossRef\]](#)
41. Roberts, W.G.; Ung, E.; Whalen, P.; Cooper, B.; Hulford, C.; Autry, C.; Richter, D.; Emerson, E.; Lin, J.; Kath, J.; et al. Antitumor Activity and Pharmacology of a Selective Focal Adhesion Kinase Inhibitor, PF-562271. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1935–1944. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Choudhary, S.R.; Khan, M.A.; Harris, G.; Picker, D.; Jacob, G.S.; Block, T.; Shailubhai, K. Deactivation of Akt and STAT3 Signaling Promotes Apoptosis, Inhibits Proliferation, and Enhances the Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells to an Anticancer Agent, Atiprimod. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 112–121. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Wadhawan, A.; Smith, C.; Nicholson, R.L.; Barrett-Lee, P.; Hiscox, S. Src-Mediated Regulation of Homotypic Cell Adhesion: Implications for Cancer Progression and Opportunities for Therapeutic Intervention. *Cancer Treat. Rev.* **2011**, *37*, 234–241. [\[CrossRef\]](#)

44. Roskoski, R. Src Protein-Tyrosine Kinase Structure, Mechanism, and Small Molecule Inhibitors. *Pharmacol. Res.* **2015**, *94*, 9–25. [\[CrossRef\]](#)
45. Yu, W.; Yang, L.; Li, T.; Zhang, Y. Cadherin Signaling in Cancer: Its Functions and Role as a Therapeutic Target. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 989. [\[CrossRef\]](#)
46. Takeichi, M. Cadherins in Cancer: Implications for Invasion and Metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1993**, *5*, 806–811. [\[CrossRef\]](#)
47. Cao, Z.-Q.; Wang, Z.; Leng, P. Aberrant N-Cadherin Expression in Cancer. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109320. [\[CrossRef\]](#)
48. Stemmler, M.P. Cadherins in Development and Cancer. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 835–850. [\[CrossRef\]](#)
49. Cavallaro, U.; Schaffhauser, B.; Christofori, G. Cadherins and the Tumour Progression: Is It All in a Switch? *Cancer Lett.* **2002**, *176*, 123–128. [\[CrossRef\]](#)
50. Kaszak, L.; Witkowska-Pilaszewicz, O.; Niewiadomska, Z.; Dworecka-Kaszak, B.; Ngosa Toka, F.; Jurka, P. Role of Cadherins in Cancer—A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7624. [\[CrossRef\]](#)
51. Riven, I.A.; Reynoso, E.A.; Ochoa-Teran, A. Microwave-assisted synthesis of cycloalkanespirohydantoin and piperidylspirohydantoin as precursors of restricted α -amino acids. *Arkivoc* **2011**, *2011*, 260–271. [\[CrossRef\]](#)
52. García-González, V.; Mas-Oliva, J. Amyloidogenic Properties of a D/N Mutated 12 Amino Acid Fragment of the C-Terminal Domain of the Cholesteryl-Ester Transfer Protein (CETP). *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2019–2035. [\[CrossRef\]](#)
53. Galindo-Hernandez, O.; Serna-Marquez, N.; Castillo-Sanchez, R.; Salazar, E.P. Extracellular Vesicles from MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Stimulated with Linoleic Acid Promote an EMT-like Process in MCF10A Cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **2014**, *91*, 299–310. [\[CrossRef\]](#)
54. Rosner, B. *Fundamentals of Biostatistics*, 6th ed.; Thomson-Brooks/Cole: Belmont, CA, USA, 2006.

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