

Evaluation of the Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) inhibitory activity of pimaranes and their glycosyl derivatives

Avaliação da atividade inibitória da proteína tipo Lisil oxidase 2 (LOXL2) de pimaranos e seus derivados glicosídicos

Sandra Ferreira^{1,4} , Patrícia Rijo^{1,2} , João G. Costa¹ , Nuno Saraiva¹ , Beatriz Santos¹, Clara Uriel³ , Ana María Gómez³ , A. M. Díaz-Lanza⁴ , & Ana S. Fernandes¹  

Keywords: breast cancer, lysyl oxidase-like 2, inhibitors, pimaranes, *Aeollanthus rydingianus*, MTT

Palavras-chave: cancro da mama, proteína tipo lisil oxidase 2, inibidores, pimaranos, *Aeollanthus rydingianus*, MTT

To Cite:

Ferreira, S., Rijo P., Costa, J. G., Saraiva N., Santos, B., Uriel, C., Gómez, A. M., Díaz-Lanza, A. M., & Fernandes, A. S. (2023) Evaluation of the Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2) inhibitory activity of pimaranes and their glycosyl derivatives. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 20(1), 13-24.

 [10.19277/bbr.20.1.305](https://doi.org/10.19277/bbr.20.1.305)

1 - CBIOS - Center for Biosciences & Health Technologies, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

2 - Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

3 - Instituto de Química Orgánica, CSIC, Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid, Spain

4 - Universidad de Alcalá de Henares. Facultad de Farmacia, Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Farmacología); Ctra. Madrid-Barcelona km. 33,600 28805 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Correspondence to / Correspondência a:
ana.fernandes@ulusofona.pt

Received / Recebido: 20/03/2023
Accepted / Aceite: 15/05/2023

Abstract

Lysyl oxidase (LOX) and LOX-like 1-4 (LOXL 1-4) enzymes catalyze the cross-linking of elastin and collagen in the extracellular matrix, facilitating cell migration and invasion. The inhibition of these enzymes, particularly LOXL2, has been suggested as a therapeutic strategy to prevent breast cancer metastasis. In this work, new natural LOXL2 inhibitors were searched from *Aeollanthus rydingianus*, a medicinal plant rich in bioactive products. Five pimarane diterpenoids, two isolated from the plant and three derivatives, were tested. These compounds have been described for their bioactive properties such as anti-tumor, anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities. In this regard, we intended to explore the mechanisms of these compounds by studying their effects on LOXL2 activity. Two pimarane diterpenoids showed a mild LOXL2 inhibitory activity as evaluated by an Amplex Ultra Red-based technique. The cytotoxicity of the most active compound was analyzed by the MTT assay in the MDA-MB-231 cell line, representative of triple-negative breast cancer. This compound decreased cell viability as single agent and increased the cytotoxic effect of doxorubicin. Its glycoconjugate was considerably more toxic, likely due to a higher uptake by cancer cells.

Resumo

A lisil oxidase (LOX) e as proteínas tipo lisil oxidase 1-4 (LOXL 1-4) catalisam a ligação cruzada de elastina e colagénio na matriz extracelular, facilitando a migração e invasão celulares. A inibição destas enzimas, particularmente LOXL2, tem sido sugerida como estratégia terapêutica para prevenir metástases do cancro da mama. Neste trabalho, novos inibidores naturais de LOXL2 foram investigados a partir de *Aeollanthus rydingianus*, uma planta medicinal rica em produtos bioativos. Cinco diterpenóides de pimarano, dois isolados da planta e três derivados foram testados. Estes compostos foram previamente descritos pelas suas propriedades bioativas, tais como antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana. Neste sentido, pretendemos explorar os mecanismos destes compostos, estudando os seus efeitos na atividade da LOXL2. Dois diterpenóides pimaranos mostraram uma ligeira atividade inibitória da LOXL2, avaliada por uma técnica baseada no Amplex Ultra Red. A toxicidade do composto mais ativo foi analisada pelo ensaio MTT na linha celular MDA-MB-231, representativa do cancro da mama triplo negativo. Este composto diminuiu a viabilidade celular como agente isolado e aumentou o efeito citotóxico da doxorubicina. O seu glicoconjugado foi consideravelmente mais tóxico, provavelmente devido a uma maior captação pelas células tumorais.

Introduction

Lysyl oxidase (LOX) and lysyl oxidase-like 1 to 4 (LOXL1-LOXL4) are copper-dependent amine oxidases that covalently cross-link collagen and elastin in the extracellular matrix (ECM; Figure 1) (1–3). These LOX/LOXL proteins have been implicated in the pathogeny of several diseases, including cancer, as they are expressed in various tissues and organs (4). They serve different roles, such as regulation of gene transcription and control of cell proliferation and motility (5). The expression deregulation of these enzymes has been implicated in fibrotic processes, cancer, and neurodegenerative diseases (6–8). LOXL2 is the most studied of these enzymes and presents extracellular and intracellular activities (Figure 1) (9). Extracellularly, its overexpression promotes collagen cross-linking mediated by the deamination of lysine residues, which increases the rigidity of the ECM. Such changes in the density and rigidity of the ECM promote the invasion and progression of tumor cells through integrin modulation (9). At the intracellular level, LOXL2 can promote the activation of processes that deregulate the epithelial-to-mesenchymal transition. Some of these mechanisms are influenced by hydrogen peroxide, which is formed during the catalytic process of this enzyme and is related to the invasive effects of LOXL2 (10).

LOXL2 has been studied in breast cancer and particularly in triple-negative breast cancer (TNBC). This type of tumor represents 15% to 20% of breast cancer cases and is strongly related to metastatic disease (11,12). Previous studies have shown that the expression of LOX (13) and LOXL2 (14) is increased in TNBC tumors. The expression of LOX and LOXL1-4 has also been studied in the representative TNBC human cell line MDA-MB-23, suggesting that the LOX and LOXL2 enzymes have the strongest association with an invasive/metastatic phenotype (15). A bioinformatics analysis made by our group showed that LOXL2 expression is associated with lower disease-free survival in breast cancer patients, particularly in the triple-negative and luminal A subtypes (16). Moreover, in TNBC, LOXL2 expression correlates with increased cancer-associated fibroblasts and endothelial cells and with decreased lymphocyte infiltrates, which are also characteristics of a poorer prognosis (16). These

Introdução

Lisil oxidase (LOX) e proteínas tipo lisil oxidase 1 a 4 (LOXL1-LOXL4) são aminas oxidase dependentes do cobre que covalentemente se ligam ao colagénio e elastina na matriz extracelular (MEC; Figura 1) (1–3). Estas proteínas LOX/LOXL têm sido implicadas na patogenicidade de várias doenças, incluindo o cancro, uma vez que são expressas em vários tecidos e órgãos (4). Desempenham papéis diferentes, tais como a regulação da transcrição genética e o controlo da proliferação e motilidade celulares(5). A desregulação da expressão destas enzimas tem sido implicada em processos fibróticos, cancro e doenças neurodegenerativas (6–8) . LOXL2 é a mais estudada destas enzimas e apresenta atividades extracelulares e intracelulares (Figura 1) (9) . Extracelularmente, a sua sobreexpressão promove a reticulação do colagénio mediada pela desaminação dos resíduos de lisina, o que aumenta a rigidez da MEC. Tais alterações na densidade e rigidez da MEC promovem a invasão e progressão das células tumorais, através da modulação da integrina (9). A nível intracelular, a LOXL2 promove a ativação de processos que desregulam a transição epitelial-mesenquimatosa. Alguns destes mecanismos são influenciados pelo peróxido de hidrogénio, que é formado durante o processo catalítico desta enzima e está relacionado com os efeitos invasivos da LOXL2 (10).

LOXL2 tem sido estudada no cancro da mama e particularmente no cancro da mama triplo negativo (CMTN). Este tipo de tumor representa 15% a 20% dos casos de cancro da mama e está fortemente relacionado com a doença metastática (11,12). Estudos anteriores mostraram que a expressão de LOX (13) e LOXL2 (14) está aumentada nos tumores de CMTN. A expressão de LOX e LOXL1-4 também foi estudada na linha celular humana representativa de CMTN, MDA-MB-23, sugerindo que as enzimas LOX e LOXL2 têm a associação mais forte com um fenótipo invasivo/metastático (15). Uma análise bioinformática feita pelo nosso grupo mostrou que a expressão da LOXL2 está associada a uma menor sobrevida livre de doença em doentes com cancro da mama, particularmente nos subtipos triplo negativo e luminal A (16). Além disso, no CMTN, a expressão de LOXL2 correlaciona-se com o aumento de fibroblastos e células endoteliais associadas ao cancro e com a diminuição dos infiltrados linfocitários, que são também características de um pior prognóstico (16).

aspects, along with the scarce therapeutic options currently available, make TNBC a suitable candidate to benefit from LOXL2 inhibition.

Since antiquity, plants have been used as sources of compounds with therapeutic activity. In fact, the first LOX inhibitor known was β -aminopropionitrile (BAPN) is a phytochemical compound present in sweet pea (*Lathyrus odoratus* L.) (17,18). The current knowledge and available technology can greatly

Estes aspetos, juntamente com as escassas opções terapêuticas atualmente disponíveis, tornam o CMTN um candidato adequado para beneficiar da inibição da LOXL2.

As plantas têm sido utilizadas desde a antiguidade como fontes de compostos com atividade terapêutica. De facto, o primeiro inibidor da LOX conhecido foi o β -aminopropionitrilo (BAPN), um composto fitoquímico presente nas ervilhas-doce

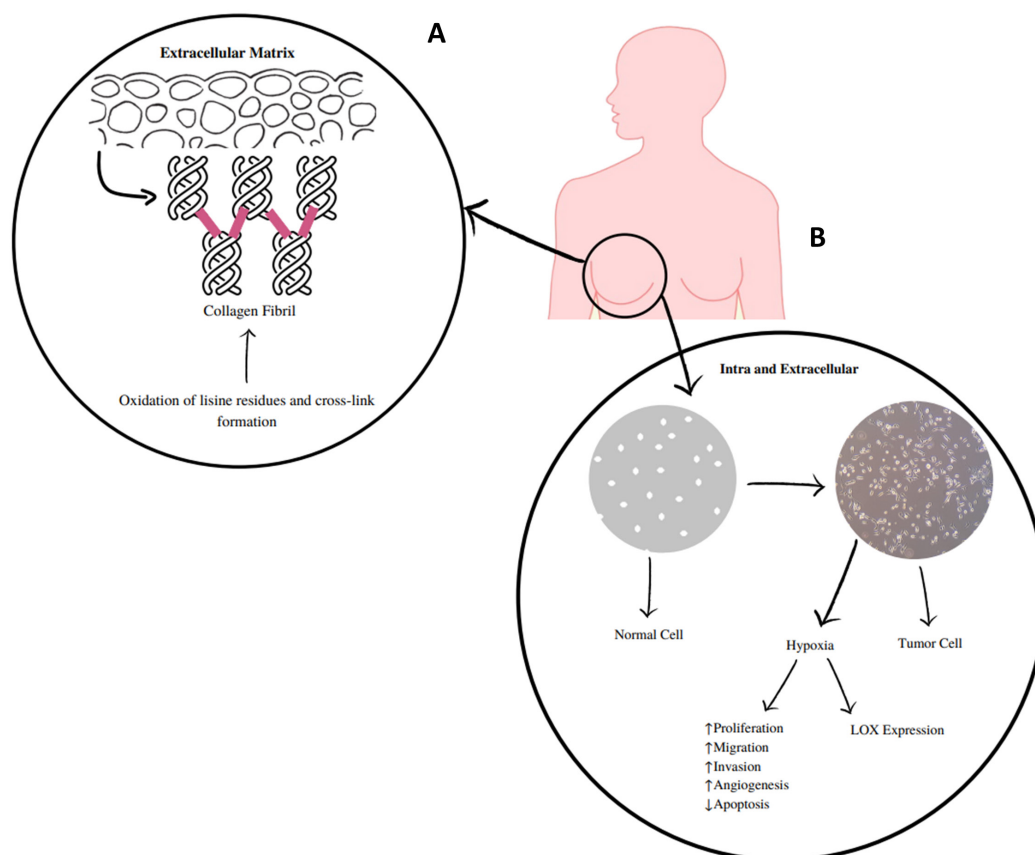


Figure 1 - A) LOXs catalyze the cross-linking of elastin and collagen in the extracellular matrix, which is mediated by the deamination of lysine residues and increases the stiffness of the extracellular matrix.

B) Extracellular and intracellular mechanisms of LOX and LOXL 1-4. These enzymes, in particular LOXL2, are implicated in extracellular and intracellular activities. At the extracellular level, they cause changes in the density and rigidity of the extracellular matrix that promote the invasion and progression of tumor cells. Intracellularly, tumor hypoxia promotes LOXL2 upregulation, which will contribute to the deregulation of the epithelial-to-mesenchymal transition and to the pro-invasive effects of LOXL2. Some of these mechanisms are influenced by the release of hydrogen peroxide.

Figura 1 - A) LOXs catalisam a ligação cruzada da elastina e colagénio na matriz extracelular, a qual é mediada pela desaminação dos resíduos de lisina e aumenta a rigidez da matriz extracelular.

B) Mecanismos extracelulares e intracelulares das LOX e LOXL 1-4. Estas enzimas, em particular LOXL2, estão implicadas em atividades extracelulares e intracelulares. A nível extracelular, elas causam alterações na densidade e rigidez da matriz extracelular que promovem a invasão e progressão das células tumorais. Intracelularmente, a hipóxia tumoral promove a sobreexpressão da LOXL2, o que irá contribuir para a desregulação da transição epitelial-mesenquimatosa e para os efeitos pró-invasivos da LOXL2. Alguns destes mecanismos são influenciados pela libertação de peróxido de hidrogénio.

contribute to the discovery of new drugs obtained from traditional plants.

In this work, pimarane-type compounds isolated from *Aeollanthus rydingianus* (Lamiaceae) or their derivatives were screened as potential inhibitors of the human LOXL2 (hLOXL2). The genus *Aeollanthus* Mart. ex Spreng. (Labiatae) comprises over 100 species and occurs mainly in southern Africa and Brazil. Plants of this genus contain compounds with interesting biological activities, including antimicrobial, antifungal and anticonvulsant properties (19). The species studied herein, *Aeollanthus rydingianus* Van Jaarsv. and A.E. van Wyk, grows in northern Namibia and southern Angola in soils that are relatively moist and acidic (20). From the aerial parts of this plant, different pimarane compounds have been isolated (19). These compounds have been described for their therapeutic properties, including antitumor, anti-inflammatory, analgesic, and antibacterial activities (19,21). Glycosidic derivatives were included as it has been reported/shown that linking a glycoside moiety to a given drug can improve its efficacy and selectivity for cancer cells. Due to their higher metabolic rate, the uptake of glycosylated drugs, likely mediated by glucose transport proteins, is much higher in cancer cells than in normal ones. In this context, the glycosylation of bioactive natural compounds may provide tumor-targeting properties, minimizing potentially deleterious systemic effects (22).

Material and methods

Chemicals

Five pimarane compounds (Figure 2), 7, 15-isopimaradien-19-ol [1], O- β -D-mano-copyranoside-7,15-isopimaradiene [2], 19-O- β -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene [3], lagascatriol [4] and lagascatriol-16-O- α -D-mannopyranoside [5] (19,21) were obtained as previously described (21). Human LOXL2 was acquired from Sino Biological (Beijing, China). Amplex Ultra Red (AUR), sodium borate and BAPN were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Urea was obtained from VWR International (Darmstadt, Germany). Sodium chloride was acquired from José M. Vaz Pereira, S.A (Benavente, Portugal). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and fetal bovine serum (FBS) were purchased

(*Lathyrus odoratus* L.) (17,18). Os conhecimentos e tecnologia atualmente disponíveis podem contribuir grandemente para a descoberta de novos fármacos obtidos a partir de plantas tradicionais.

Neste trabalho, foram investigados como potenciais inibidores da LOXL2 humana (hLOXL2) compostos do tipo pimarano, isolados a partir de *Aeollanthus rydingianus* (Lamiaceae) ou derivados destes. O género *Aeollanthus* Mart. ex Spreng. (Labiatae) inclui mais de 100 espécies e ocorre principalmente na África Austral e no Brasil. As plantas deste género contêm compostos com atividades biológicas interessantes, incluindo propriedades antimicrobianas, antifúngicas e anticonvulsivantes (19). A espécie aqui estudada, *Aeollanthus rydingianus* Van Jaarsv. e A.E. van Wyk, cresce no norte da Namíbia e no sul de Angola, em solos relativamente húmidos e ácidos (20). A partir das partes aéreas desta planta, foram isolados diferentes compostos pimaranos (19). Estes compostos bioativos foram descritos pelas suas propriedades terapêuticas como antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana (19,21). Os derivados glicosídicos foram incluídos, uma vez que foi descrito que a ligação de uma fração glicosídica a um determinado fármaco melhora a sua eficácia e seletividade para as células cancerígenas. Devido à sua taxa metabólica mais elevada, a absorção de fármacos glicosilados, provavelmente mediada por proteínas transportadoras de glicose, é muito mais elevada nas células cancerígenas do que nas normais. Neste contexto, a glicosilação de compostos naturais bioativos proporcionará propriedades de alvos tumorais, minimizando efeitos sistémicos potencialmente deletérios (22).

Material e métodos

Produtos químicos

Os compostos de pimarano (Figura 2), 7,15-isopimaradieno-19-ol [1], O- β -D-manoco-piranoside-7,15-isopimaradiene [2], 19-O- β -D-glucopiranoside-7,15-isopimaradiene [3], lagascatriol [4] e lagascatriol-16-O- α -D-manopiranosideo [5] (19,21) foram obtidos como descrito anteriormente (21). A LOXL2 humana foi adquirida à Sino Biological (Pequim, China). Amplex Ultra Red (AUR), borato de sódio e BAPN foram adquiridos à Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). A ureia foi obtida da VWR International (Darmstadt, Alemanha). O clorito de sódio foi adquirido a José M. Vaz Pereira, S.A (Benavente, Portugal). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos à Biowest (Nuaille, França). Foram obtidos da

from Biowest (Nuaille, France). Horseradish peroxidase (HRP), penicillin-streptomycin solution, trypsin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), Dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol, and doxorubicin were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Matrigel™ was purchased from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

Biochemical assay

The activity of human hLOXL2 was determined by measuring the hydrogen peroxide released during the reaction using the AUR reagent in the presence of HRP (23,24). Compounds and hLOXL2 (10 nM) were added to Assay Buffer (0.05 M sodium borate, 1.2 M urea, and 0.01 M sodium chloride at pH 8.0) in black-wall 96-well optical plates. After 15 minutes of incubation at 37°C, cadaverine (0.5 mM), AUR (50 μM) and HRP (0.5 U mL⁻¹) were added. The fluorescence was measured on a BioTek Synergy HTX, using an excitation wavelength of 563 nm and emission of 587 nm over 50-minute kinetics. The rate of the reaction was obtained from the slope of the linear portion of the read. The method was validated using BAPN as positive control (24).

Merck (Darmstadt, Alemanha) peroxidase de rábano (HRP), solução de penicilina-estreptomicina, tripsina, brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, e doxorubicina. Matrigel™ foi comprado à BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

Ensaio bioquímico

A atividade da hLOXL2 humana foi determinada pela medição do peróxido de hidrogénio libertado durante a reação, utilizando o reagente AUR na presença do HRP (23,24). Os compostos e a hLOXL2 (10 nM) foram adicionados ao tampão de ensaio (0,05 M de borato de sódio, 1,2 M de ureia, e 0,01 M de cloreto de sódio a pH 8,0), em placas óticas de 96 poços de fundo preto. Após 15 minutos de incubação a 37°C, foram adicionados cadaverina (0,5 mM), AUR (50 μM) e HRP (0,5 U mL⁻¹). A fluorescência foi medida numa BioTek Synergy HTX, usando um comprimento de onda de excitação de 563 nm e emissão de 587 nm, numa cinética ao longo de 50 minutos. A velocidade da reação foi obtida a partir do declive da região linear da curva. O método foi validado usando BAPN como controlo positivo (24).

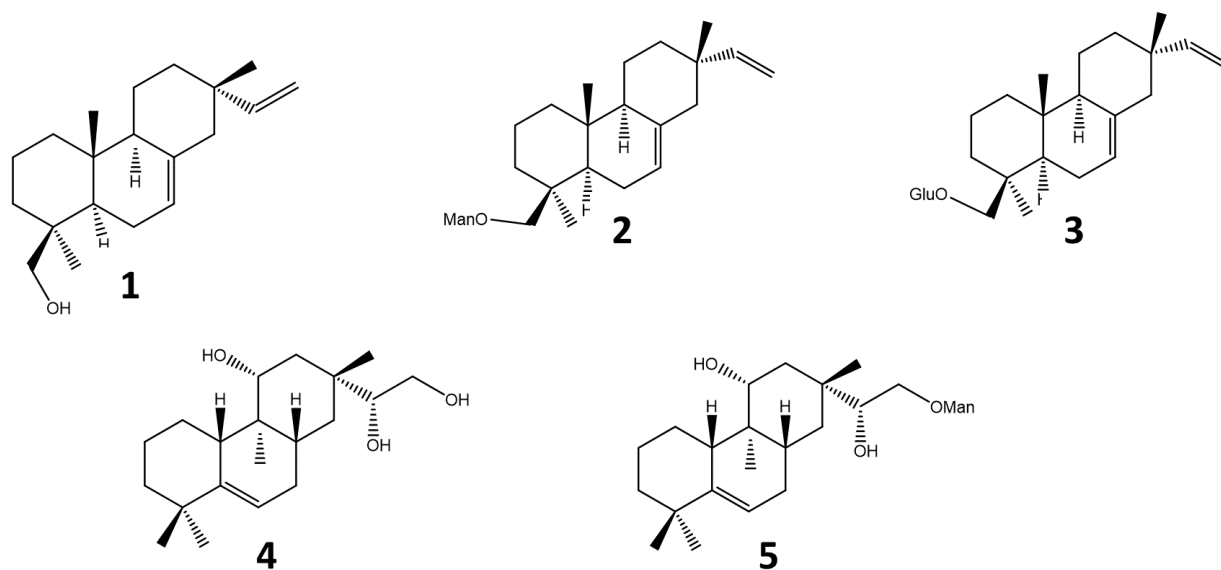


Figure 2 - Pimaranes diterpenes isolated from *Aeollanthus rydingianus* (**1** and **4**) and their derivatives (**2**, **3** and **5**). [1] 7, 15-isopimaradien-19-ol, [2] 19-O- α -D-mannopyranoside-7,15-isopimaradiene, [3] 19-O- β -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene; [4] lagascatriol; [5] lagascatriol-16-O- α -D-mannopyranoside.

Figura 2 - Diterpenos pimaranos isolados a partir de *Aeollanthus rydingianus* (**1** e **4**) e seus derivados (**2**, **3** e **5**). [1] 7, 15-isopimaradien-19-ol, [2] 19-O- α -D-mannopyranoside-7,15-isopimaradiene, [3] 19-O- β -D-glucopyranoside-7,15-isopimaradiene; [4] lagascatriol; [5] lagasca-triol-16-O- α -D-mannopyranoside.

Cell culture

The human breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from ATCC. Cells were kept in DMEM supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin. Cultures were incubated at 37 °C, under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in air.

Cell viability assay

The effect of the pimaranes on cell viability, either individually or in combination with doxorubicin, was determined by the MTT assay. Briefly, 6×10^3 cells, were cultured in 200 μ L of a complete medium in 96-well plates. The cells were grown for 24 h and then exposed to different concentrations of the pimaranes and/or doxorubicin (1 and 5 μ M), for a 24 h or 48 h period. The MTT reduction assay was performed as previously described (25). Three to seven independent experiments were performed, and five replicate cultures were used for each condition. The IC₅₀ values were calculated using GraphPad software (version 8), using the logarithm of the concentrations versus the percentage of cell viability.

Statistical Analysis

Differences in mean values of the results were evaluated by Student's t-test, after assessing the normality and the homogeneity of the variances of continuous variables. The analyses were performed with SPSS statistical package (version 25, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Cultura de células

A linha de células humanas de cancro da mama MDA-MB-231 foi obtida da ATCC. As células foram mantidas em DMEM suplementadas com 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37 °C, sob uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ no ar.

Ensaio de viabilidade celular

O efeito dos pimaranos na viabilidade celular, quer aplicados isoladamente quer em combinação com a doxorubicina, foi determinado pelo ensaio do MTT. Em resumo, 6×10^3 células, foram cultivadas em 200 μ L de meio completo em placas de 96 poços. As células foram mantidas durante 24 h e depois expostas a diferentes concentrações de pimaranos e/ou doxorubicina (1 e 5 μ M), durante um período de 24 h ou 48 h. O ensaio de redução do MTT foi realizado como descrito anteriormente (25). Foram realizadas três a sete experiências independentes e foram realizados cinco replicados para cada condição. Os valores de IC₅₀ foram calculados no software GraphPad (versão 8), utilizando o logaritmo das concentrações versus a percentagem de viabilidade celular.

Análise Estatística

As diferenças nos valores médios dos resultados foram avaliadas pelo teste de t-Student, depois de avaliar a normalidade e a homogeneidade das variâncias das variáveis contínuas. As análises foram realizadas com o software estatístico SPSS (versão 25, SPSS Inc. Chicago, IL, EUA).

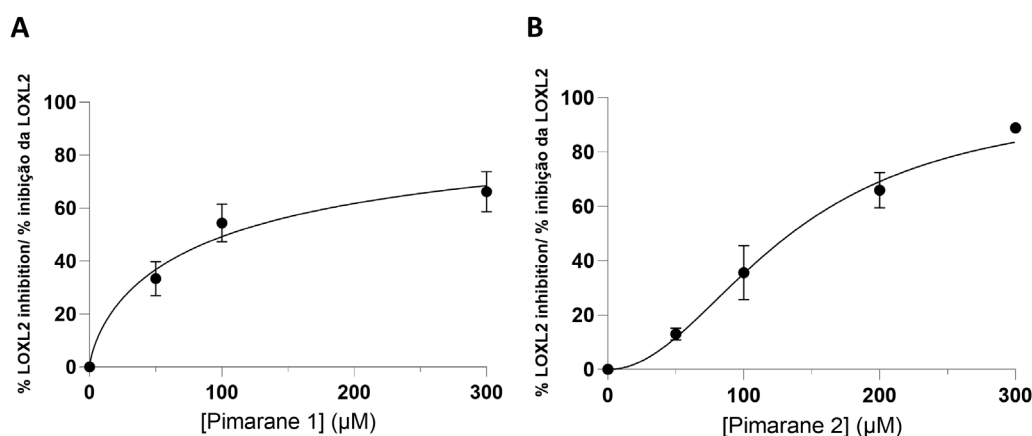


Figure 3 - LOXL2 inhibition assay, according to the Amplex Ultra Red technique. **A)** Pimarane 1. **B)** Pimarane 2.
Figure 3 - Ensaio de inibição da LOXL2, de acordo com a técnica *Amplex Ultra Red*. **A)** Pimarano 1. **B)** Pimarano 2.

Table 1 - IC_{50} values for the inhibition of hLOXL2, obtained by the Amplex Ultra Red technique. BAPN - β -aminopropionitrile; ND - Not determined.

Tabela 1 - Valores de IC_{50} para a inibição da hLOXL2, obtidos pela técnica *Amplex Ultra Red*. BAPN - β -aminopropionitrilo; ND - Não Determinado.

Compound / Composto	IC_{50}
BAPN	228.1 nM
1	104.4 μ M
2	134.8 μ M
3	ND
4	ND
5	ND

Results

The five compounds studied in this work were screened for their ability to inhibit hLOXL2, using the Amplex Ultra Red methodology. The obtained results are shown in Table 1. The assay was first validated with BAPN, as it has been previously described as a LOXL2 inhibitor. An IC_{50} value of 228.1 nM was obtained for BAPN, which is in accordance with the values reported in the literature (24).

All pimaranes were initially tested at a concentration of 100 μ M. The naturally occurring pimarane **1** and its mannose derivative **2** were able to inhibit hLOXL2. The non-glycosylated form had a higher activity. The respective concentration-response curves are shown in Figure 3. Both compounds exhibited IC_{50} values in the micromolar range: 104 μ M for compound **1** and 134 μ M for compound **2** (Table 1). Contrarily to compound **1** and its mannose derivative (**2**), the glucose conjugate of compound **1** (pimarane **3**) did not show hLOXL2 inhibitory activity at the 100 μ M concentration. The same lack of activity was observed for the natural pimarane **4** and its mannose derivative **5**.

Pimaranes **1** and **2**, which showed LOXL2 inhibitory activity, were further studied to characterize their impact on cell viability. The cytotoxicity study was carried out in the MDA-MB-231 cell line, using the MTT assay, after treatment periods of 24 and 48 hours as described in the previous section. The concentrations of pimarane compounds **1** and **2** were chosen to allow for the definition of the cytotoxicity profile, i.e., from non-toxic to highly toxic concentrations. However, in the case of 24 hour incubation with compound **1**, the limited solubility of the compound precluded studies with higher concentrations.

Resultados

Os cinco compostos estudados neste trabalho foram analisados quanto à sua capacidade de inibir a hLOXL2, utilizando a metodologia *Amplex Ultra Red*. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. O ensaio foi primeiro validado com BAPN, como controlo positivo. Para este composto, foi obtido um valor IC_{50} de 228,1 nM, o que está de acordo com os valores reportados na literatura (24).

Todos os pimaranos foram inicialmente testados a uma concentração de 100 μ M. O pimarano **1**, de ocorrência natural, e o seu derivado de manose **2** foram capazes de inibir a hLOXL2. A forma não glicosilada demonstrou ser a mais ativa. As respetivas curvas de concentração-resposta são mostradas na Figura 3. Ambos os compostos exibiram valores de IC_{50} na gama micromolar: 104 μ M para o composto **1** e 134 μ M para o composto **2** (Tabela 1). Contrariamente ao composto **1** e ao seu derivado de manose **2**, o conjugado de glucose do composto **1** (pimarano **3**) não mostrou atividade inibidora de hLOXL2 na concentração de 100 μ M. A mesma falta de atividade foi observada para o pimarano natural **4** e para o seu derivado de manose **5**.

Os pimaranos **1** e **2**, que mostraram atividade inibitória da LOXL2, foram ainda estudados para caracterizar o seu impacto na viabilidade celular. O estudo da citotoxicidade foi realizado na linha celular MDA-MB-231, utilizando o ensaio MTT, após períodos de tratamento de 24 e 48 horas, como descrito na secção anterior. As concentrações dos compostos **1** e **2** foram escolhidas de modo a permitir a definição do perfil de citotoxicidade, ou seja, desde concentrações não tóxicas até concentrações altamente tóxicas. No entanto, no caso da incubação de 24 horas com o composto **1**, a solubilidade limitada do composto impediu a realização de estudos com concentrações mais elevadas.

Pimarane **1** exerted cytotoxic effects that were concentration- and time-dependent, as depicted in Figures 4A and 4B. The IC_{50} values obtained for this compound were 113.4 μ M (24 h) and 49.5 μ M (48 h). Since the inhibition of LOXL2 has been suggested as a strategy to sensitize TNBC cells to conventional therapy (26), the cytotoxicity of pimarane **1** (50 μ M) in combination with doxorubicin (1 and 5 μ M) was also evaluated (Figure 4C). As expected, doxorubicin alone decreased the cell viability in a concentration-dependent manner. Moreover, when pimarane **1** was given in combination with doxorubicin,

O pimarano **1** exerceu efeitos citotóxicos que eram dependentes da concentração e do tempo, como descrito nas Figuras 4A e 4B. Os valores de IC_{50} obtidos para este composto foram 113,4 μ M (24 h-incubação) e 49,5 μ M (48 h-tratamento). Uma vez que a inibição da LOXL2 foi sugerida como estratégia para sensibilizar as células CMTN à terapêutica convencional (26), foi também realizado o estudo de citotoxicidade do pimarano **1** (50 μ M) em combinação com a doxorubicina (1 e 5 μ M). Os resultados são mostrados na Figura 4C. Como esperado, a doxorubicina isoladamente diminuiu a viabilidade celular de uma forma concentração-dependente. Além disso, quando o pimarano **1** foi administrado em

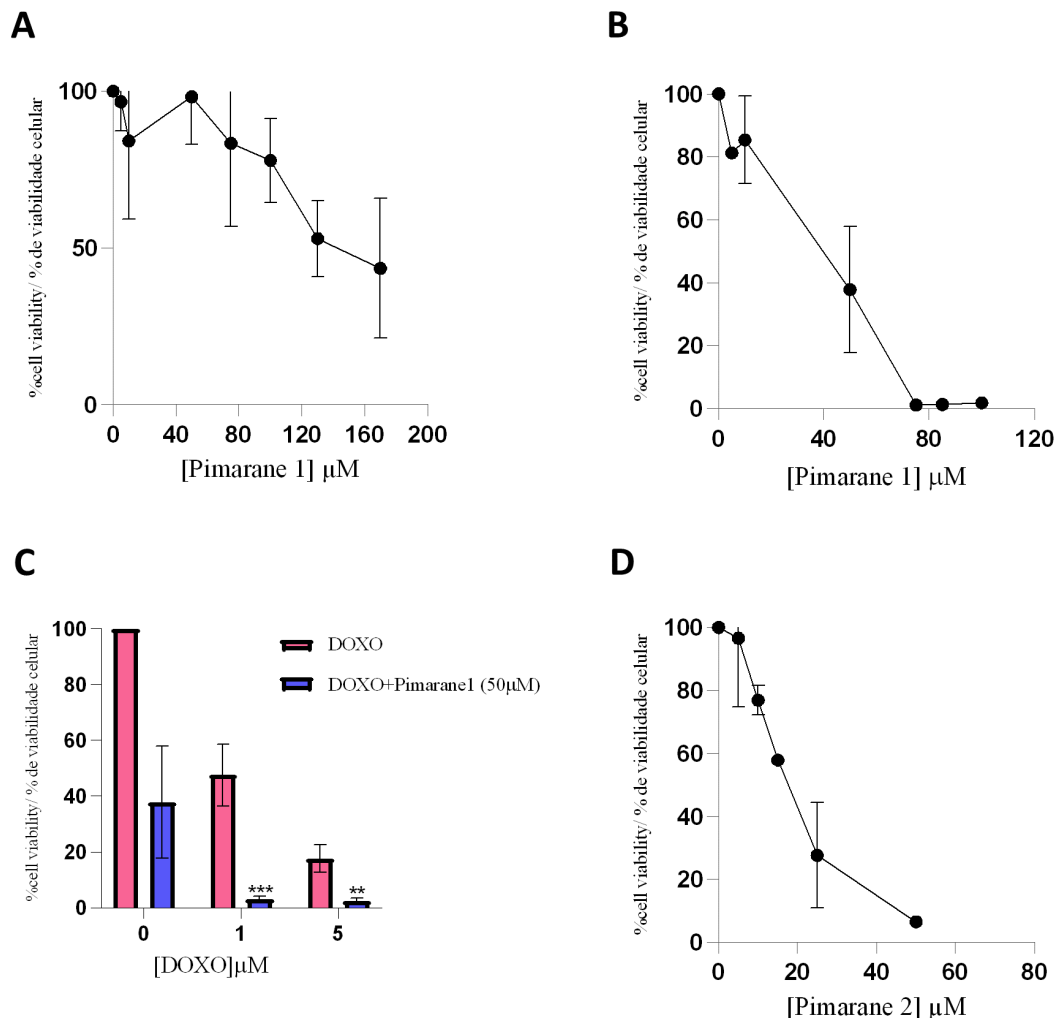


Figure 4 - Impact of pimaranes **1** and **2** in the viability of MDA-MD-231 cells, evaluated by the MTT assay. **A)** Pimarane **1**, 24 hours incubation. **B)** Pimarane **1**, 48 hours incubation. **C)** Co-incubation of pimarane **1** (50 μ M) and doxorubicin, 48 hours incubation; *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ when compared with doxorubicin-exposed cells. **D)** Pimarane **2**, 24 hours incubation.

Figura 4 - Impacto dos pimaranos **1** e **2** na viabilidade das células MDA-MD-231, avaliado pelo ensaio do MTT. **A)** Pimarano **1**, 24 horas de incubação. **B)** Pimarano **1**, 48 horas de incubação. **C)** Co-incubação de pimarano **1** (50 μ M) e doxorubicina, 48 horas de incubação; *** $p < 0.001$ e ** $p < 0.01$ quando comparado com as células expostas à doxorubicina **D)** Pimarano **2**, 24 horas de incubação.

the cytotoxicity was much more pronounced as a consequence of a possible additive effect. The difference in the viability of the cells that received the combined treatment when compared to the viability of the cells only exposed to doxorubicin was statistically significant for both concentrations of doxorubicin ($p < 0.01$). Pimarane **2** also decreased the viability of MDA-MB-231 cells in a concentration-dependent manner (Figure 4 D), with an IC_{50} value of $16.6 \mu\text{M}$ for 24 hour treatment. Comparing both pimaranes, it is clear that pimarane **2** is considerably more toxic than pimarane **1**.

Discussion and conclusions

LOXL2 inhibitors have been suggested as a promising treatment to prevent metastasis and invasion of breast cancer (3). Among the different breast cancer subtypes, TNBC seems particularly relevant in this context.

A screening of some pimarane diterpenoid compounds with the abietane skeleton, obtained from a *Lameacea* plant, was conducted. From the five compounds analyzed, only pimaranes **1** and **2** demonstrated inhibition of LOXL2 activity. However, although these two compounds inhibited LOXL2, they presented higher IC_{50} values when compared to the positive control BAPN or to synthetic LOXL2 inhibitors previously reported in the literature (27–29). The concentrations of pimarane compounds **1** and **2** required for an efficient LOXL2 inhibition may be difficult to achieve in an eventual clinical context.

For the cytotoxicity assay, the cell line MDA-MB-231 was chosen. These cells are commonly used as an *in vitro* model of TNBC since they are highly aggressive, invasive, and poorly differentiated, and lack oestrogen and progesterone receptors expression, as well as HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) amplification. Furthermore, these cells express high levels of LOXL2, and their invasiveness is mediated by proteolytic degradation of the extracellular matrix. For the combinatory assay, the anticancer drug doxorubicin was used, as it is widely used in chemotherapy regimens for metastatic breast cancer (25). Both pimaranes **1** and **2** exhibited considerable

combinação com a doxorubicina, a citotoxicidade foi muito mais pronunciada como consequência de um possível efeito aditivo. A diferença na viabilidade celular das células que receberam o tratamento combinado quando comparada com a viabilidade celular das células apenas expostas à doxorubicina foi estatisticamente significativa para ambas as concentrações de doxorubicina ($p < 0,01$). O pimarano **2** também diminuiu a viabilidade das células MDA-MB-231 de uma forma dependente da concentração (Figura 4 D). Este composto mostrou um valor de IC_{50} de $16,6 \mu\text{M}$ para o tratamento de 24 horas. Comparando ambos os pimaranos, é evidente que o pimarane **2** é consideravelmente mais tóxico do que o pimarano **1**.

Discussão e conclusões

Os inibidores da LOXL2 foram sugeridos como um tratamento promissor para prevenir a metastização e a invasão do cancro da mama (3). Entre os diferentes subtipos de cancro da mama, o CMTN parece ser particularmente relevante neste contexto.

Foi realizado um *screening* de alguns compostos diterpenóides de pimarano com o esqueleto de abietano, obtidos a partir de uma planta de *Lameacea*. Dos cinco compostos analisados, apenas os pimaranos **1** e **2** demonstraram inibir a atividade da LOXL2. No entanto, embora estes dois compostos tenham inibido a LOXL2, apresentaram valores de IC_{50} mais elevados quando comparados com o controlo positivo BAPN ou com os inibidores sintéticos da LOXL2 anteriormente relatados na literatura (27–29). As concentrações dos compostos pimaranos **1** e **2** necessárias para uma inibição eficiente da LOXL2 podem ser difíceis de alcançar num eventual contexto clínico.

Para o ensaio da citotoxicidade, foi escolhida a linha celular MDA-MB-231. Estas células são normalmente utilizadas como modelo *in vitro* de CMTN, uma vez que são altamente agressivas, invasivas e pouco diferenciadas, e carecem de expressão dos recetores de estrogénio e progesterona, bem como de amplificação de HER2 (recetor do fator de crescimento epidérmico humano 2). Além disso, estas células expressam níveis elevados de LOXL2, e a sua invasividade é mediada pela degradação proteolítica da matriz extracelular. Para o ensaio combinatório, foi utilizado o fármaco antineoplásico doxorubicina, uma vez que é amplamente utilizado em regimes de quimioterapia para o cancro da mama metastático (25). Ambos os pimaranos **1** e **2** exibiram

cytotoxicity in MDA-MB-231 cells at concentrations below those at which LOXL2 activity is inhibited. These data suggest that although the compounds could be further explored as potential anticancer drugs, their interest as LOXL2 inhibitors is limited. In addition, mechanisms unrelated to the inhibition of LOXL2 are likely involved in the cytotoxic effects observed. Likewise, the enhancement of cytotoxicity observed when cells were simultaneously exposed to pimarane **1** and doxorubicin is probably not related to LOXL2 inhibition but ascribed to other mechanisms.

When comparing the cytotoxicity of pimarane compounds **1** and **2**, it is noticeable that pimarane **2** is ~7-fold more toxic than pimarane **1**. The structural difference between these compounds relies on the mannose group. The presence of the sugar may increase the uptake of glycoconjugates by cancer cells, leading to more pronounced cytotoxic effects. Due to the Warburg effect, cancerous tissues consume larger amounts of glucose compared to normal tissue. The glucose transporter GLUT-1 is widely overexpressed in a large percentage of human cancers, including breast cancer (30). Therefore, conjugation of anticancer agents to sugars takes advantage of GLUT-mediated cellular entry for preferential delivery to cancer cells, improving efficacy and selectivity (30). This fact may justify the differential cytotoxicity observed for pimaranes **1** and **2**.

The strategy presented here could be applied to screen other natural compounds as potential LOXL2 inhibitors. Although the compounds studied in this work are not promising as novel inhibitors of LOXL2, pimaranes **1** and **2** could be useful as a starting point for structural optimization towards the design of more potent inhibitors, with potential therapeutic interest. Furthermore, our results corroborate the idea that linking a sugar moiety to a given anticancer drug could constitute a targeting strategy to increase the efficacy of anticancer drugs against breast cancer.

uma considerável citotoxicidade nas células MDA-MB-231 em concentrações abaixo das que inibiram a atividade da LOXL2. Estes dados sugerem que embora os compostos pudessem ser mais explorados como potenciais fármacos anticancerígenos, o seu interesse como inibidores da LOXL2 é limitado. Além disso, os mecanismos não relacionados com a inibição da LOXL2 estão provavelmente envolvidos nos efeitos citotóxicos observados. Do mesmo modo, o aumento da citotoxicidade observado quando as células foram simultaneamente expostas ao pimarano **1** e à doxorubicina provavelmente não está relacionado com a inibição da LOXL2, mas é atribuído a outros mecanismos.

Quando se compara a citotoxicidade dos compostos pimaranos **1** e **2**, nota-se que o pimarano **2** é ~7 vezes mais tóxico do que o pimarano **1**. A diferença estrutural entre estes compostos depende do grupo da manose. A presença do açúcar pode aumentar a absorção de glicoconjugados pelas células cancerígenas, levando a efeitos citotóxicos mais pronunciados. Sabe-se que, devido ao efeito Warburg, os tecidos cancerosos consomem maiores quantidades de glicose em comparação com os tecidos normais. O GLUT-1, o transportador de glicose, é amplamente sobreexpresso numa grande percentagem de cânceros humanos, incluindo o cancro da mama (30). Portanto, a conjugação de agentes anticancerígenos com açúcares permite tirar partido da entrada celular mediada por GLUT para um fornecimento preferencial às células cancerosas, melhorando a eficácia e a seletividade (30). Este facto pode justificar a citotoxicidade diferencial observada para os pimaranos **1** e **2**.

A estratégia do presente trabalho poderia ser aplicada ao estudo de outros compostos naturais como potenciais inibidores da LOXL2. Embora os compostos estudados neste trabalho não sejam promissores como novos inibidores da LOXL2, os pimaranos **1** e **2** poderiam ser úteis como ponto de partida para a otimização estrutural no sentido da conceção de inibidores mais potentes, com potencial interesse terapêutico. Além disso, os nossos resultados corroboram a ideia de que a ligação de uma fração de açúcar a um determinado fármaco anticancerígeno poderia constituir uma estratégia orientada para aumentar a eficácia dos medicamentos anticancerígenos contra o cancro da mama.

Author Contributions

Conceptualization, A.S.F. and P.R.; investigation and data analysis, S.F, J.G.C., N.S., C.U., A.M.G., D.L.A.M., A.S.F. and P.R.; writing—original draft preparation, S.F; writing—review and editing, A.S.F., J.G.C. and PR; supervision, A.S.F.; project administration, A.S.F.; funding acquisition, A.S.F. and P.R.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work is funded by national funds through FCT-Foundation for Science and Technology, I.P., under the UIDB/04567/2020 and UIDP/04567/2020 projects. Research developed with funding from Universidade Lusófona/ILIND (Grant Programmes FIPID 2019/2020 and Fazer+ ILIND/F+/EI/01/2020).

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The editors involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Contribuições dos Autores

Conceptualização, A.S.F. e P.R.; investigação e análise de dados, S.F, J.G.C., N.S., C.U., A.M.G., D.L.A.M., A.S.F. e P.R.; escrita—preparação do esboço original, S.F; escrita—revisão e edição, A.S.F., J.G.C. e PR; supervisão, A.S.F.; administração do projeto, A.S.F.; aquisição de financiamento, A.S.F. e P.R.; Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT- Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., ao abrigo dos projetos UIDB/04567/2020 e UIDP/04567/2020. Investigação desenvolvida com financiamento da Universidade Lusófona/ILIND (Programas de Bolsas FIPID 2019/2020 e Fazer+ ILIND/F+/EI/01/2020).

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Os editores envolvidos na autoria desses manuscritos não tiveram participação no processo de revisão ou decisão. Os financiadores não tiveram qualquer papel na conceção do estudo; na recolha, análise, ou interpretação dos dados; na redação do manuscrito, ou na decisão de publicar os resultados.

References / Referências

- Rucker, R. B., Kosonen, T., Clegg, M. S., Mitchell, A. E., Rucker, B. R., Uriu-Hare, J. Y., & Keen, C. L. (1998). Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5 Suppl), 996S–1002S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.5.996S>
- Molnar J., Fong K.S.K., He Q.P., Hayashi K., Kim Y., Fong S.F.T. et al. (2003). Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1647(1–2), 220–4. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(03)00053-0)
- Ferreira S., Saraiva N., Rijo P., and Fernandes A.S. (2021). LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants*, 10(2), 312. <https://doi.org/10.3390/antiox10020312>
- Hayashi, K., Fong, K. S., Mercier, F., Boyd, C. D., Csiszar, K., & Hayashi, M. (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *Journal of molecular histology*, 35(8–9), 845–855. <https://doi.org/10.1007/s10735-004-2340-1>
- Barker, H. E., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(8), 540–552. <https://doi.org/10.1038/nrc3319>
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H. M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., Garcia, C. A., Velayo, A. C., Jorgensen, B., Biermann, D., Tsai, D., Green, J., Zaffryar-Eilot, S., Holzer, A., Ogg, S., Thai, D., ... Smith, V. (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nature medicine*, 16(9), 1009–1017. <https://doi.org/10.1038/nm.2208>
- Yeung, T., Georges, P. C., Flanagan, L. A., Marg, B., Ortiz, M., Funaki, M., Zahir, N., Ming, W., Weaver, V., & Janmey, P. A. (2005). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(1), 24–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>
- Kumari S., Panda T.K., and Pradhan T. (2017). Lysyl Oxidase: Its Diversity in Health and Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 32(2), 134–41. <https://doi.org/10.1007/s12291-016-0576-7>
- Setargew Y.F.I., Wyllie K., Grant R.D., Chitty J.L., and Cox T.R. (2021). Targeting lysyl oxidase family mediated matrix cross-linking as an anti-stromal therapy in solid tumours. *Cancers*, 13(3), 491. <https://doi.org/10.3390/cancers13030491>
- Wang W., Wang X., Yao F., and Huang C. (2022). Lysyl Oxidase Family Proteins: Prospective Therapeutic Targets in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12270. <https://doi.org/10.3390/ijms232012270>
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ breast cancer*, 8(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>
- Luo C., Wang P., He S., Zhu J., Shi Y., and Wang J. (2022). Progress and Prospect of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 919072. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.919072>
- Leo, C., Cotic, C., Pomp, V., Fink, D., & Varga, Z. (2018). Overexpression of Lox in triple-negative breast cancer. *Annals of diagnostic pathology*, 34, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2018.03.009>
- Ahn, S. G., Dong, S. M., Oshima, A., Kim, W. H., Lee, H. M., Lee, S. A., Kwon, S. H., Lee, J. H., Lee, J. M., Jeong, J., Lee, H. D., & Green, J. E. (2013). LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, 141(1), 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2662-3>
- Molani Gol R., and Kheirouri S. (2021). The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: A Systematic Review. *Nutrition and Cancer*, 74(2), 405–22. [10.1080/01635581.2021.1897631](https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1897631)
- Ramos, S., Ferreira, S., Fernandes, A. S., & Saraiva, N. (2022). Lysyl Oxidases Expression and Breast Cancer Progression: A Bioinformatic Analysis. *Frontiers in pharmacology*, 13, 883998. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.883998>
- Sherif H. M. (2010). In search of a new therapeutic target for the treatment of genetically triggered thoracic aortic aneurysms and cardiovascular conditions: insights from human and animal lathyrism. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 11(3), 271–276. <https://doi.org/10.1510/icvts.2010.239681>
- Schilling E.D., Strong F.M. (1955). Isolation, Structure and Synthesis of a Lathyrus Factor from *L. Odoratus*. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 2843–2845.
- Rijo P., Simões M.F., Duarte A., and Rodríguez B. (2009). Isopimarane diterpenoids from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity. *Phytochemistry*, 70(9), 1161–5. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2009.06.008>
- van Jaarsveld A.E.J., and van Wyk A.E. (2005). Notes on african plants The *Aeollanthus abyssinicus* group (Labiatae). *Bothalia* 35(2), 157-160. <https://doi.org/10.4102/abc.v35i2.391>
- Isca V.M.S., Andrade J., Fernandes A.S., Paixão P., Uriel C., Gómez A.M. et al. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules*, 25(18), 4250. <https://doi.org/10.3390/molecules25184250>
- Sorg B.L., Hull W.E., Kliem H.C., Mier W., and Wiessler M. (2005). Synthesis and NMR characterization of hydroxyurea and mesylglycol glycoconjugates as drug candidates for targeted cancer chemotherapy. *Carbohydrate Research* 340(2), 181–9. <https://doi.org/10.1016/J.CARRES.2004.11.024>
- Guerreiro, Í., Vidovic, B., Costa, J. G., Martins, M., Ferreira, S., Oliveira, N. G., Saraiva, N., & Fernandes, A. S. (2023). The Dietary Isothiocyanate Erucin Reduces Kidney Cell Motility by Disturbing Tubulin Polymerization. *Molecular nutrition & food research*, 67(3), e2200581. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202200581>
- Hutchinson, J. H., Rowbottom, M. W., Lonergan, D., Darlington, J., Prodanovich, P., King, C. D., Evans, J. F., & Bain, G. (2017). Small Molecule Lysyl Oxidase-like 2 (LOXL2) Inhibitors: The Identification of an Inhibitor Selective for LOXL2 over LOX. *ACS medicinal chemistry letters*, 8(4), 423–427. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.7b00014>
- Flório, A., Saraiva, N., Cerqueira, S., Almeida, N., Parsons, M., Batinic-Haberle, I., Miranda, J. P., Costa, J. G., Carrara, G., Castro, M., Oliveira, N. G., & Fernandes, A. S. (2019). The manganese(III) porphyrin MnTnHex-2-PyP5+ modulates intracellular ROS and breast cancer cell migration: Impact on doxorubicin-treated cells. *Redox biology*, 20, 367–378. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.10.016>
- Cebrià-Costa J.P., Pascual-Reguant L., Gonzalez-Perez A., Serra-Bardenys G., Querol J., Cosín M. et al. (2020). LOXL2-mediated H3K4 oxidation reduces chromatin accessibility in triple-negative breast cancer cells. *Oncogene*, 39(1), 79–121. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0969-1>
- Smithen, D. A., Leung, L. M. H., Challinor, M., Lawrence, R., Tang, H., Niculescu-Duvaz, D., Pearce, S. P., Mcleary, R., Lopes, F., Aljarah, M., Brown, M., Johnson, L., Thomson, G., Marais, R., & Springer, C. (2020). 2-Aminomethylene-5-sulfonylthiazole Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX) and LOXL2 Show Significant Efficacy in Delaying Tumor Growth. *Journal of medicinal chemistry*, 63(5), 2308–2324. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01112>
- Leung L., Niculescu-Duvaz D., Smithen D., Lopes F., Callens C., McLeary R. et al. (2019). Anti-metastatic Inhibitors of Lysyl Oxidase (LOX): Design and Structure-Activity Relationships. *Journal of medicinal chemistry*, 62(12), 5863–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00335>
- Rowbottom M.W., Bain G., Calderon I., Lasof T., Lonergan D., Lai A. et al. (2017). Identification of 4-(Aminomethyl)-6-(trifluoromethyl)-2-(phenoxy) pyridine Derivatives as Potent, Selective, and Orally Efficacious Inhibitors of the Copper-Dependent Amine Oxidase, Lysyl Oxidase-Like 2 (LOXL2). *Journal of medicinal chemistry*, 60(10), 4403–23. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00345>
- Calvaresi, E. C., & Hergenrother, P. J. (2013). Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer. *Chemical science*, 4(6), 2319–2333. <https://doi.org/10.1039/C3SC22205E>