



Universidad Nacional Autónoma de
México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO
DE LOS COMPUESTOS DITIOCARBAMATOS
HÍBRIDOS DERIVADOS DEL SISTEMA
(1S,4S)-2,5-DIAZABICICLO[2.2.1]HEPTANO,
EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER
CÉRVICO-UTERINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

NELLY DÁVILA ESTRELLA



DIRECTOR: DRA. PATRICIA GARCÍA LÓPEZ
ASESOR: DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS

Cd. de México

Octubre 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Farmacología de la subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección de la Dra. Patricia García López.

Se realizó una colaboración con el Dr. José Ignacio Regla Contreras del Laboratorio de Investigación en Síntesis de Fármacos, de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM, donde se realizaron las síntesis de los compuestos evaluados en el presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS



A la Dra. Patricia García López por haberme dado la oportunidad de colaborar en la unidad de Farmacología L-8, por brindarme el apoyo necesario para realizar el proyecto.

Al biólogo Rafael Jurado por tener paciencia y tolerancia en mi proceso de aprendizaje en las técnicas y conocimientos que fueron necesarios.



A los Doctores José Ignacio Regla Contreras y Sujey Laskar por haber confiado en mí durante todo este tiempo y ofrecerme la oportunidad de crecer en mi vida académica.



A mi segunda casa, que me formó como profesionista, a mis profesores, instalaciones y actividades deportivas, donde reforcé mi personalidad, aclaré mi mente y fijé mis convicciones. Al coach Miguel Victoria por el entrenamiento, competencias, derrotas y victorias que obtuve durante estos 5 años.

AGRADECIMIENTOS.

A mis profesores y amigos Manuel López e Ivan Monsalvo por siempre aclarar mis dudas, darme asesorías y por todos los buenos momentos que compartimos desde mi llegada a la FES.

A mis amigos de propedéutico, Teresa Medina, Arturo Sánchez, Rodolfo Carrillo, Iván Buendía, Simón Cruz, Daniela Nuñez, Julieta Corona, Edgar Hernández porque a su lado mi estancia en la FES fue definitiva.

A mis colegas Eduardo Castillo, Bryan Rolón, Axel García, por sacarme una sonrisa, por ser tan divertidos, tener buena vibra y transmitirme esa energía, por todas las aventuras que hemos compartido.

A todas aquellas personas que estuvieron conmigo en los buenos y malos momentos durante toda mi etapa como estudiante, Abigail Mandujano, Eduardo Ontiveros, Josefyn Hinojosa, Karla Arista, Alejandro Guerrero, Dessire Arias, Obed González, Arturo Díaz, Antonio González, Carlos Brito.

A Monserrat Llaguno, Hector Vázquez, Pavel Figueroa, Vanesa Izquierdo, Aldahir Hernández, y Gabriela Mondragón quienes fueron mi soporte en el INCAN, gracias por todos los eventos sociales y sus grandes consejos.

A Dios y a la vida que después de tanto esfuerzo, sacrificio y dedicación me permitieron culminar una etapa más en mi vida.

DEDICATORIAS

A mi familia

A mi padre Ernesto García Y Mejía, por tu apoyo incondicional durante toda mi educación, por tus sabias palabras, consejos y valores. Por creer en mí, por hacer sacrificios para que pudiera lograr nuestro cometido. Por cuidarme y protegerme en todo momento. Y sobre todo por el amor que un verdadero padre le puede dar a una hija. Te amo.

A mi madre Margarita Dávila Estrella, por tus palabras de aliento, tu compañía, por ser exigente, porque gracias a esto forjé mi carácter. Por hacer sacrificios para nuestro futuro, por siempre preocuparte de nuestro bienestar, por ser tan graciosa y tener ese ímpetu de coraje. Y sobre todo gracias por darme la vida má. Te amo.

A mi hermano Rodrigo Dávila Estrella, por todas y cada una de las palabras de superación, fortaleza e inteligencia, por ser un apoyo más en mi vida, por todos los buenos y malos momentos compartidos, por mostrarme independencia, seguridad y pasión por la vida.

A mi hermano Ernesto García Dávila, por la confianza, paciencia, madurez y humildad que me muestras a tu corta edad, gracias por todas las alegrías que hemos tenido, los momentos memorables. Por dejarme ser tu ejemplo a seguir. Mi compañero de vida pequeño horrs.

A mi abuelita Margarita Estrella por estar en todos los momentos importantes de mi vida, por los consejos, anécdotas, fiestas y su comida que nunca se me olvidarán. Por ser un ejemplo de vida para

todas las personas que la rodeamos ya que irradia bondad, humildad y tolerancia. Usted siempre tendrá mi respeto y admiración.

A la familia Roldán Dávila porque siempre están al pendiente, y han sido una parte importante de mi desarrollo personal, en especial mi prima Liz Roldán Dávila, porque desde pequeñas hemos sido compañeras de metas.

A mis confidentes

A mi mejor amiga Katia Esperanza Gómez Benítez, porque contigo mi vida dio un giro inesperado, mis mejores momentos fueron a tu lado, supiste escucharme y apoyarme en todo momento. Eres de las mejores personas que me pude topar en este camino. Gracias por darme valor y esperanza. Te quiero mucho Kat.

A mi mejor amigo Jorge Valdés Ruíz, por tu compañía, tus consejos y buenos deseos siempre, por estar para mí en mis momentos de amargura, felicidad y pasión, por siempre lograr sacarme una sonrisa y demostrarme el verdadero significado de amistad. Te quiero mucho Jorgiís.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

*“Una ciencia no es solo una disciplina de razón, sino también de
romance y pasión”*

Stephen Hawking

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un
científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño
colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un
cuento de hadas”*

Marie Curie

*“Si A es el éxito en la vida, entonces $A = X + Y + Z$. Donde X es el
trabajo, Y es el placer y Z es mantener la boca cerrada”*

Albert Einstein

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ABREVIATURAS	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. MARCO TEÓRICO.....	7
1. <i>Cáncer</i>	7
1.1. Clasificación	9
1.2. Incidencia.....	9
1.3. Cáncer cérvico-uterino (CaCu)	10
1.3.1. Incidencia	11
1.3.2. Causas.....	12
1.3.3. Diagnóstico.....	12
1.3.4. Prevención	13
1.3.5. Tratamiento.....	13
2. <i>Ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema (1S,4S)-2,5diazabicyclo[2.2.1]heptano</i>	14
2.1. Compuestos ditiocarbamatos	15
2.2. Sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (DBH)	16
2.3. Posible mecanismo de acción.....	20
3. <i>Ciclo celular</i>	21
4. <i>Muerte celular</i>	23
4.1. Apoptosis	23
4.2. Necrosis	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVOS	28
1. <i>General</i>	28
1.1. Particulares	28

VI. MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. <i>Material</i>	29
1.1. Reactivos	30
1.2. Equipos	30
2. <i>Métodos</i>	31
2.1. Cultivo de células.....	31
2.2. Sembrado de células	31
2.3. Exposición.	31
2.4. Ensayo de viabilidad celular mediante XTT	32
2.5. Ensayo de viabilidad celular con Cristal Violeta (CV).....	32
2.6. Ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo usando Anexina V y 7AAD	33
2.7. Ensayo ROS.....	34
2.8. Ciclo celular.....	35
2.9. Análisis estadístico.	35
VII. RESULTADOS	36
1. Efecto citotóxico de los compuestos ditiocarbamatos derivados del sistema DBH heptano en las líneas celulares de CaCu.	36
2. Morfología celular.....	40
3. Evaluación de la inducción de apoptosis después del tratamiento con el compuesto SL-78.	41
4. Efecto del compuesto SL-78 en la generación de ROS.....	44
5. Evaluación de Ciclo Celular.	45
VIII. DISCUSIÓN	48
IX. CONCLUSIONES	53
X. PERSPECTIVAS	54
XI. REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reproducción descontrolada de células neoplásicas, formando tumor. ⁹	7
Figura 2. Tejido epitelial del cérvix. ¹⁸	11
Figura 3. Los 10 tipos de cáncer más frecuentes que causan muerte en México. ²⁰	12
Figura 4. Molécula de Cisplatino	14
Figura 5. Compuesto SL-30.	15
Figura 6. Molécula de ditiocarbamato	16
Figura 7. (a) Piperazina; (b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.	16
Figura 8. Tipos de inversiones de a) Piperazina y b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.	17
Figura 9. Estructuras químicas de la ciprofloxacina y danofloxacina.	17
Figura 10. Moléculas que en su estructura incluyen al DBH.	18
Figura 11. Enfoque híbrido del diseño de un nuevo tipo de compuestos antineoplásicos	18
Figura 12. Compuesto SL-30 dividida en 3 segmentos	19
Figura 13. Estructura de los compuestos Ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.	20
Figura 14. Formación de los microtubulos unidad estructural del citoesqueleto en las células eucariotas. ³⁴	21
Figura 15. Fases del ciclo celular. ³⁸	22
Figura 16. Factores externos que incrementan ROS.	24
Figura 17. Esquema del proceso de apoptosis y necrosis de la célula. ResearchGate.	25
Figura 18. Diferencias entre etapas de apoptosis en una población celular	34
Figura 19. Efecto de CDDP sobre la viabilidad celular en HeLa , SiHa y CaSki.	37
Figura 20. Efecto de los compuestos más activos sobre la viabilidad celular.	38
Figura 21. Morfología de las células de CaCu después de 72 h de exposición del compuesto SL-78.	40
Figura 22. Dot Plots representativos de apoptosis de las células HeLa	41
Figura 23. Dot Plots representativos de apoptosis de las células SiHa	42
Figura 24. Dot Plots representativos de apoptosis de las células CaSki	43
Figura 25. Curvas representativas de la intensidad de fluorescencia ROS	44
Figura 26. Histogramas representativos del ciclo celular de las células HeLa.	45
Figura 27. Histogramas representativos del ciclo celular de las células SiHa.	46
Figura 28. Histogramas representativos del ciclo celular de las células CaSki.	47

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ATCC: American Type Culture Collection
Boc: terc-butóxicarbonilo
CaCu: Cáncer cérvico-uterino
CDDP: Cis-Diamino-dicloro-platino / Cisplatino
CDK: Cinasas dependientes de ciclinas
cél: Célula
CI₅₀: Concentración Inhibitoria 50
DBH: Diazabicyclo heptano
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: Dimetil sulfóxido
DS: Desviación estándar
FS: fosfatidilserina
IP: Yoduro de propidio
mg: miligramos
MIF: Media de Intensidad de Fluorescencia
min: minutos
mL: mililitros
nm: nanómetros
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBS: Solución Buffer de Fosfatos
ROS: Especies reactivas de oxígeno
rmp: revoluciones por minuto
VPH: virus del papiloma humano
°C: Grados Celsius
µL: microlitros
µM: micromolar
% : Por ciento
7 AAD: 7-Amino-Actinomicina D

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un cáncer ginecológico importante en los países en desarrollo, aunque los programas de detección se han implementado desde el año 1975; se presenta un incremento en la tasa de nuevos casos. Además, se ha predicho que, en los próximos 10 años, si no hubiera ninguna intervención médica, el 66% de toda la displasia progresaría a un carcinoma *in situ*. El virus del papiloma humano (VPH) es un factor etiológico conocido para el 99% de los casos de CaCu.¹ Los virus del papiloma humano (VPH) son un grupo de más de 200 virus relacionados. Los tipos de VPH que se transmiten sexualmente y que están relacionados con el desarrollo del cáncer corresponden a dos categorías: bajo riesgo, como son los tipos 6 y 11 que originan el 90% de las verrugas genitales, y alto riesgo un ejemplo son los tipos 16 y 18, estos son responsables de la mayoría de los cánceres ocasionados por VPH.²

En la actualidad, el cáncer de cérvix es considerado como una enfermedad potencialmente curable en casos de detección temprana. Desafortunadamente la mayoría de los casos son diagnosticados en estados metastásicos y estados avanzados, implicando un mal pronóstico. El tratamiento para el carcinoma cervical es la combinación de quimioterapia a base de cisplatino y radioterapia.³

El Cisplatino y sus derivados son fármacos importantes en la terapia de cáncer cervical. Sin embargo, la administración de cisplatino, se ha asociado con efectos secundarios graves, incluyendo nefrotoxicidad y eventos neurotóxicos. Por otra parte, en etapas avanzadas, esta patología adquiere resistencia a cisplatino, debido

a varios factores como la disminución de la acumulación intratumoral del fármaco o menor respuesta apoptótica. Por lo tanto, se buscan nuevos agentes o nuevos regímenes de combinación con cisplatino con el fin de aumentar la actividad antitumoral y disminuir los efectos adversos.⁴

Debido a este problema de la quimioterapia convencional, en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad de nuevos compuestos sintetizados que incorporan el sistema (1*S*,4*S*)-2,5diazabicyclo[2.2.1]heptano; una diamina quirál con equilibrio conformacional restringido. Se ha reportado que con la introducción de centros estereogénicos en las moléculas, se puede modular la actividad biológica de muchos fármacos, debido a que se incrementan las interacciones fármaco-receptor más estables, lo que traerá como consecuencia un aumento en la eficacia terapéutica y una disminución de la toxicidad.⁵ Además, también es conocido que las restricciones conformacionales de las moléculas pueden mejorar las propiedades farmacológicas, puesto que al disminuir el número de conformeros se mejoran en términos de estabilidad, las interacciones con los receptores blancos y también se mejoran las propiedades farmacocinéticas.^{6,7} Estos nuevos compuestos fueron evaluados en líneas celulares tumorales de cérvix HeLa, CaSki y SiHa

II. MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

Cáncer, del latín *Karikinos* que significa cangrejo, es el término adoptado para definir el desequilibrio de la división y crecimiento celular, caracterizado por la pérdida de la homeostasis entre la proliferación y muerte celular; dando lugar a una multiplicación acelerada y descontrolada de un grupo de células de una parte del organismo, las cuales presentan interacciones complejas que intervienen en su conducta y en su información genética, lo que modifica el correcto funcionamiento de los mecanismos reguladores del ciclo, diferenciación y muerte. Al proliferar estas células sin control, se forma un tumor (figura 1) que acaba invadiendo y desplazando a otros tejidos sanos del cuerpo.^{8, 9}

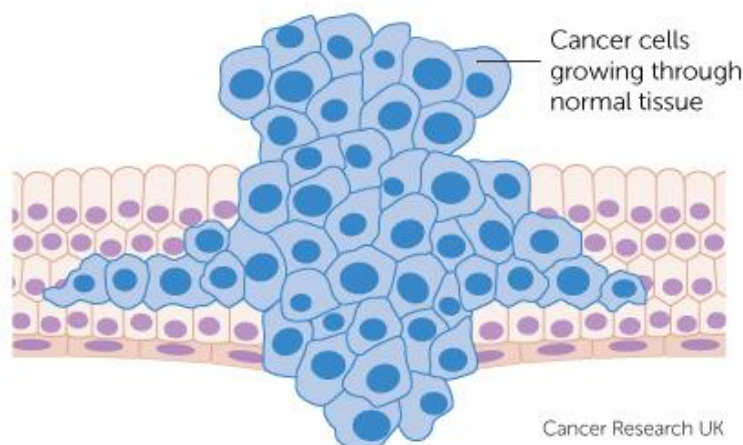


Figura 1. Reproducción descontrolada de células neoplásicas, formando tumor.⁹

Existen características fundamentales para definir a una célula tumoral, como lo son el mantenimiento de señales proliferativas, inmortalidad, inducción de invasión y

metástasis, evasión de supresores de crecimiento, inducción de angiogénesis y resistencia a la muerte entre otras.¹⁰

El cáncer es una enfermedad degenerativa e invasiva, en algunos casos las células del tumor primario migran hacia otros sitios dentro del sistema donde se están desarrollando; a este proceso se llama metástasis. En el proceso de desarrollo de un tumor secundario por una vía linfática o sanguínea, la célula maligna que se desprende del tumor primario y coloniza un órgano donde se ancla, no lo hace de manera aleatoria, sino que depende de la naturaleza del tejido invadido. La metástasis se facilita si las células tumorales producen factores de crecimiento y de angiogénesis, que es la inducción del crecimiento de vasos sanguíneos que proveen de nutrientes al tumor.¹¹

La mayoría de los cánceres forman tumores, pero algunos, por el linaje celular de su origen no lo hacen, por ejemplo, las leucemias. Todo esto se desarrolla por la interacción de factores ambientales, así como inmunológicos y genéticos específicos de cada individuo, por lo que las anomalías genéticas pueden variar entre los distintos tipos de cáncer.¹² Los cambios genéticos que causan cáncer pueden heredarse de los padres, pueden suceder también en la vida de una persona como resultado de errores que ocurren al dividirse las células o por el daño del ADN causado por algunas exposiciones del ambiente. Las exposiciones ambientales que causan cáncer son sustancias como los compuestos químicos presentes en el humo de tabaco, la radiación, como los rayos UV del Sol y las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.¹³

1.1. Clasificación

Hay más de 100 tipos de cáncer. Los tipos de cáncer reciben, en general, el nombre de los órganos o tejidos en donde se forman, también pueden describirse según el tipo de célula que los forma.¹³

- ❖ Carcinoma. Se forma en tejido epitelial, como la piel o epitelios que revisten cavidades y órganos.
- ❖ Sarcoma. Son cánceres que se forman en el hueso y tejidos blandos, incluso en músculos, tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y en el tejido fibroso.
- ❖ Leucemia. Es el cáncer de los tejidos formadores de la sangre en la médula ósea. Hay cuatro tipos comunes de la leucemia, los cuales se agrupan de acuerdo a la rapidez con la que empeora la enfermedad (aguda o crónica) y del tipo de glóbulo en dónde empieza el cáncer (linfoblástica; linfocitos T o B. Y mieloide; células plasmáticas).

1.2. Incidencia.

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, en 2015. Se le atribuyeron 8.8 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo. Cabe destacar que el cáncer es una enfermedad crónico-degenerativa de mayor incidencia entre los adultos, en comparación con los niños y jóvenes, y es un padecimiento que no hace distinción de razas, nivel socioeconómico o sexo, aunque se ha observado una diferencia en los tipos de cáncer que afectan a los hombres y mujeres. En 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó a los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado como los más comunes entre

varones; mientras que en las mujeres son los de mama, colorrectal, pulmón, cuello del útero y estómago.¹⁴

En México en 2013, del total de defunciones de la población de 20 años y más, 13.6% se debieron a algún tumor y de estas, 93.6% a tumores malignos. Por sexo, del total de defunciones por cáncer, 48.8% ocurren en varones y 51.2%, en mujeres¹⁵. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años, los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.¹⁴

1.3. Cáncer cérvico-uterino (CaCu)

El cáncer cérvico-uterino es un tumor epitelial, que se propaga por extensión local e infiltración linfática. La dispersión por la parte superior de la vagina, los parametrios, la vejiga y el recto es la forma más habitual de propagación. Los casos de cáncer cérvico uterino primarios se originan a partir de los tejidos epiteliales que recubren la mucosa cervical, del epitelio escamoso poliestratificado plano (exocérvix) o del epitelio glandular (endocérvix). Puede verse una variedad de subtipos histológicos, que varían en el grado de diferenciación y características morfológicas.¹⁶ (Figura 2).

El tipo histológico más común es el carcinoma epidermoide o de células escamosas (91.5%), seguido del adenocarcinoma (3.7%) y del carcinoma adenoescamoso (1.7%).¹⁷

Cabe destacar que las células de cáncer de cérvix empleadas para estudios *in vitro* son nombradas como HeLa, estas son de tipo adenocarcinoma (células

glandulares), SiHa son carcinoma escamoso grado II (células escamosas) y CaSki estas son de un carcinoma epidermoide (células escamosas).

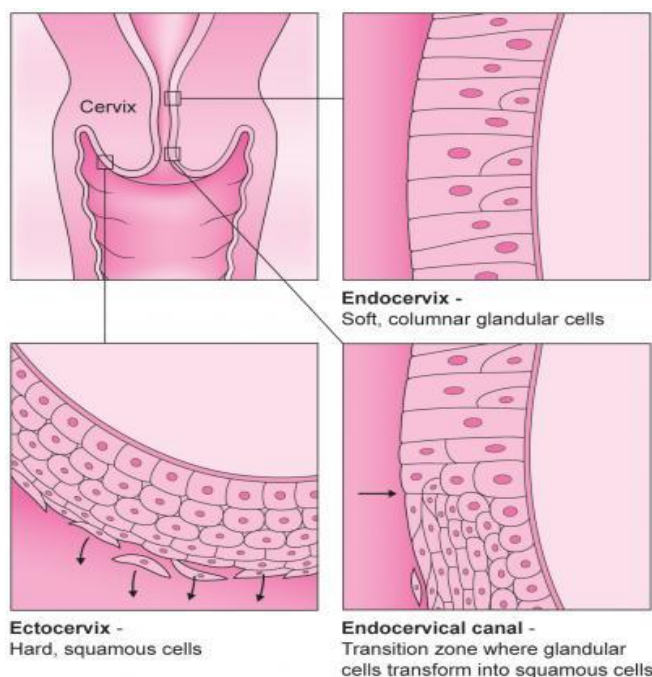


Figura 2. Tejido epitelial del cérvix.¹⁸

1.3.1. Incidencia

El cáncer cérvico-uterino es la séptima neoplasia más frecuente en la población mundial y la cuarta más frecuente entre las mujeres, con un estimado de 528 mil nuevos casos diagnosticados anualmente, 85% de los cuales se registran en países en vías de desarrollo. Ocupa el noveno lugar por causa de muerte y es el séptimo cáncer en prevalencia a nivel mundial en el 2012.

En México es la segunda causa de muerte por cáncer. Anualmente se estima una ocurrencia de 13 960 casos en mujeres (20%), con una incidencia de 23.3 casos por 100 000 mujeres (17%). En el año 2013, en el grupo específico de mujeres de

25 años y más, se registraron 3 771 defunciones en mujeres con una tasa de 11.3 defunciones por 100 000 mujeres.^{19,20}

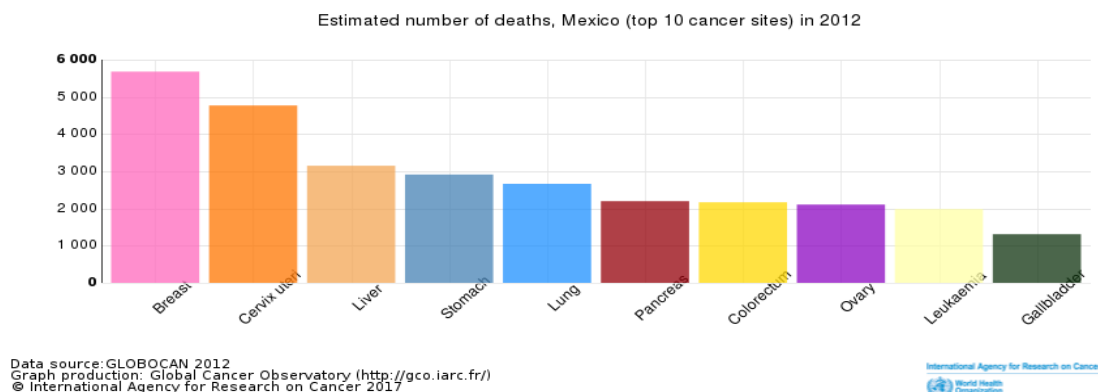


Figura 3. Los 10 tipos de cáncer más frecuentes que causan muerte en México.²⁰

1.3.2. Causas

Las principales causas del cáncer cérvico-uterino son:²¹

- Infección por VPH (16 y 18 causantes del 70%)
- Inicio de relaciones sexuales a temprana edad.
- Cambios frecuentes de parejas sexuales.
- Infecciones vaginales tratadas inadecuadamente.
- Antecedentes genéticos de cáncer y específicamente de CaCu.
- Consumo de tabaco.
- Inmunodepresión.

1.3.3. Diagnóstico

Actualmente, hay tres tipos diferentes de pruebas de detección:²¹

- Citología convencional (prueba de Papanicolaou)

- Inspección visual tras la aplicación de ácido acético.
- Pruebas de detección de tipos de VPH de alto riesgo.

1.3.4. Prevención

El enfoque debe ser multidisciplinario e incluir componentes como la educación y sensibilización de la comunidad, la movilización social, la vacunación, la detección, el tratamiento y los cuidados paliativos. ²¹

- La prevención primaria comienza con la vacunación de las niñas de 9 a 13 años antes de que inicien su vida sexual.
- Educar en materia de prácticas sexuales seguras y retrasar el inicio de la vida sexual.
- Advertir contra el consumo de tabaco.
- Realizar el examen de Papanicolaou cada año a partir de los 18 años, y cada seis meses a partir de los 35 años o si existen antecedentes genéticos de cáncer.

1.3.5. Tratamiento

De acuerdo con el estadio clínico de CaCu existen diferentes tratamientos que van desde el monitoreo constante y la eliminación de zonas con potencial carcinogénico hasta histerectomías radicales. Para etapas avanzadas de la enfermedad se considera necesaria la complementación con quimioterapias y radioterapias que tienen por objetivo disminuir el riesgo de reincidencia o metástasis.

Las radioterapias pueden ser intracavitarias, localizadas o generales, dependiendo del avance de la enfermedad, mientras que las quimioterapias pueden incluir uno o

dos fármacos, siendo los más utilizados para CaCu cisplatino, paclitaxel y carbotaxol.²²

Cisplatino (figura 4) es el fármaco de primera línea para el tratamiento de CaCu; sin embargo, la administración de cisplatino se asocia con efectos secundarios graves, incluidos nefrotóxicos y neurotóxicos. Además, en etapas avanzadas de esta patología la resistencia intrínseca al cisplatino se desarrolla debido a varios factores como una disminución intratumoral del fármaco o una respuesta menos apoptótica. Por lo tanto, se buscan nuevos agentes o regímenes en combinación con cisplatino para aumentar la actividad antineoplásica y disminuir los efectos adversos.¹

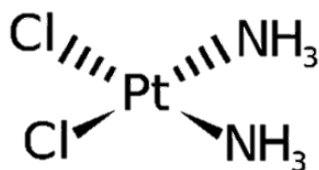


Figura 4. Molécula de Cisplatino

2. Ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema (1S,4S)-2,5diazabicyclo[2.2.1]heptano

De acuerdo a los antecedentes de la síntesis de este tipo de compuestos se conoce que exhiben baja o nula toxicidad en linfocitos humanos. Sin embargo, son potentes inductores de apoptosis, en general se ha establecido que este tipo de compuestos serán muy prometedores para el diseño de nuevos candidatos con perfil de toxicidad sistémica limitada.

Entre los compuestos sintetizados, el SL-30 (figura 5) mostró una actividad antiproliferativa moderada a nivel *in vitro*, determinándose su concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) en varias líneas celulares de cáncer como: CaSki: 70.18 μM ; MDA-MB231: 45.11 μM y SK1-Lu: 50.13 μM ; sin mostrar ningún efecto citotóxico en células normales. El mecanismo de acción estuvo mediado por apoptosis mediante la activación de caspasa-3.-²³

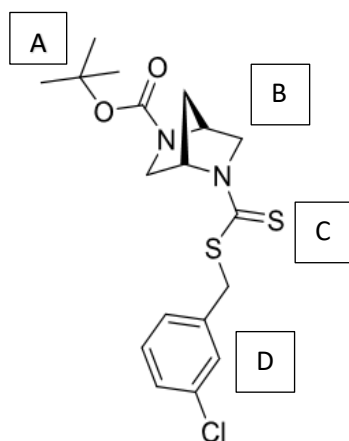


Figura 5. Compuesto SL-30. La molécula se conforma de cuatro segmentos importantes, que son el grupo *terc-Butoxicarbonilo* (Boc) (A), el sistema *Diazabicyclo heptano* (DBH) (B), el farmacóforo *ditiocarbamato* (C), y el anillo aromático (D).

A continuación se describen los segmentos que integran a los compuestos que se observan en la figura 5.

2.1. Compuestos ditiocarbamatos

Dentro de los compuestos orgánicos que exhiben una variedad de efectos biológicos están los ditiocarbamatos que son el análogo de los carbamatos en el que ambos átomos de oxígeno son reemplazados por átomos de azufre (figura 6). El grupo ditiocarbamato es un valioso farmacóforo que induce diversas actividades biológicas, tales como antihistamínicos, antibacterianos y anticancerígenos.²⁴

Estudios reportados en la literatura han demostrado que el complejo del metal de ésteres de ácidos ditiocarbámicos exhibe actividad antineoplásica.^{25,26}

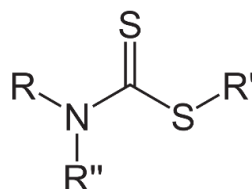


Figura 6. Molécula de ditiocarbamato

2.2. Sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano (DBH)

Dentro de la química orgánica, una de las áreas más estudiadas y desarrolladas ha sido la heterocíclica, debido a las propiedades estructurales y biológicas que induce la presencia de heteroátomos en moléculas cíclicas. El sistema (1*S*,4*S*)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, descrito por primer vez en 1966,²⁷ es estructuralmente equivalente a una piperazina, pero con equilibrio conformacional restringido (figura 7).

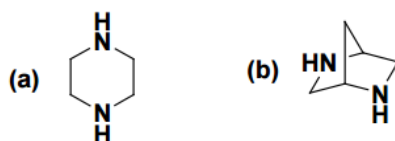


Figura 7. (a) Piperazina; (b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

La piperazina presenta dos tipos de inversiones, la inversión piramidal de los sustituyentes del nitrógeno (*inv-N*) y la inversión del anillo (*inv-Anillo*) (figura 8a),²⁸ mientras que el sistema diazabicyclo no sufre la inversión del anillo, debido al puente de metileno que le confiere rigidez, aunque sigue presentando la inversión piramidal del nitrógeno (figura 8b), además de integrar dos centros estereogénicos.

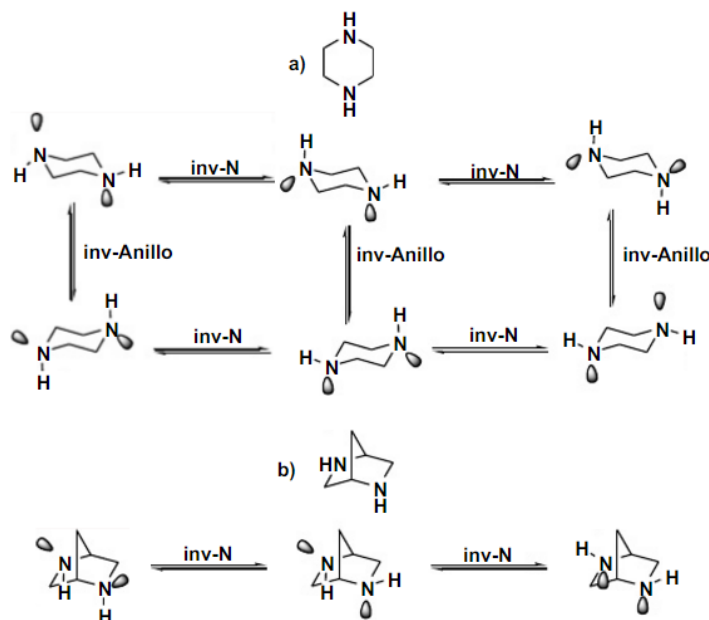


Figura 8. Tipos de inversiones de a) Piperazina y b) 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

El sistema diazabicyclo ha sido incorporado en algunas moléculas de carácter medicinal, como son ciertas quinolinas con actividad antibacteriana; tal es el caso de la danofloxacina, un análogo diazabicyclíco de la ciprofloxacina (figura 9).^{29,30}

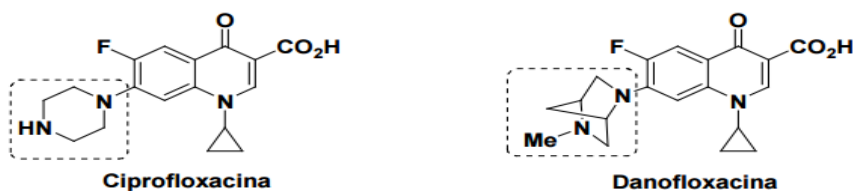


Figura 9. Estructuras químicas de la ciprofloxacina y danofloxacina, esta última sustituye el fragmento de la piperazina por el sistema diazabicyclíco.

Algunas moléculas contienen el sistema de 2,5–diazabicyclo[2.2.1]heptano, el cual posee una amplia gama de actividades biológicas únicas. En las últimas décadas varios estudios farmacológicos sobre estos compuestos se han llevado a cabo con el fin de explotar su potencial terapéutico. Hasta la fecha se han incluido actividades

biológicas antimicrobiales, antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, analgésicas, antipsicóticas, anti-Alzheimer, cardiovasculares, efectos protectores, entre otros. La actividad antimicrobiana, analgésica y antitumoral de 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano han recibido la mayor atención.

En el área de oncología el 2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano contiene moléculas que ejercen su efecto antiproliferativo a través de diferentes vías incluyendo histonas desacetilasa (figura 10 A) y B-Raf quinasa (figura 10 B) .^{31,32}

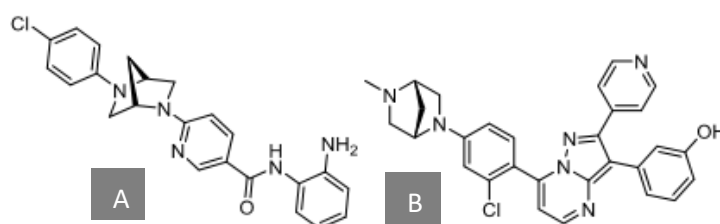


Figura 10. Moléculas que en su estructura incluyen al DBH.

Con base en estas características, el diseño de compuestos que integren el sistema diazabicyclico junto con el grupo ditiocarbamato podría conducir a moléculas con propiedades antineoplásicas. Se diseñaron y sintetizaron nuevos ditiocarbamatos derivados del sistema DBH.

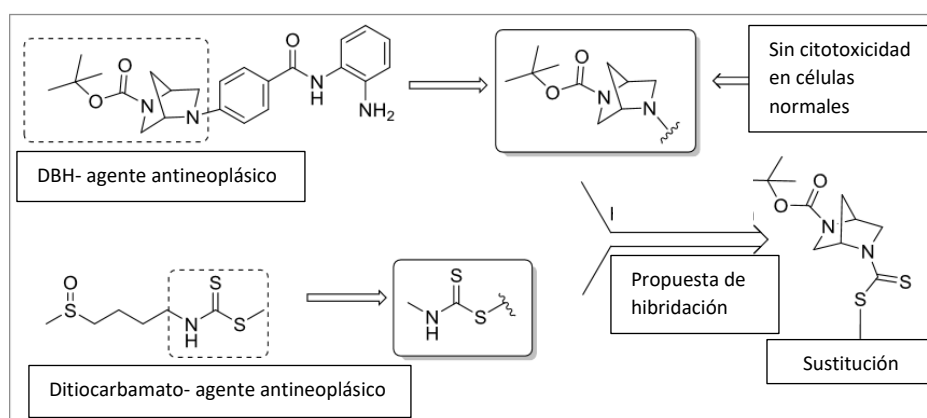


Figura 11. Enfoque híbrido del diseño de un nuevo tipo de compuestos antineoplásicos

Para hacer el estudio SAR (Relación estructura-actividad). La molécula SL-30 es dividida en tres segmentos A, B Y C respectivamente (figura 12). El segmento B se considera el núcleo del andamio; sistema DBH. Por lo tanto las modificaciones se darán en el segmento A y C. Primero se considera el segmento C. La heterociclización fue evitada a partir de estudios previos, porque no se encontró actividad, por lo que se realizan diferentes sustituciones en el anillo bencénico mediante un estudio Docking donde se introduce la molécula diseñada en el sitio de la proteína. La energía del complejo ligando-receptor permite distinguir y seleccionar los mejores ligandos, dando origen a 11 compuestos (figura 13) que son el objeto de estudio del presente trabajo. Después de conseguir la mejor modificación en el anillo bencénico de C, se considera el segmento A. El grupo Boc puede ser removido creando una sal de amina libre. Después de esto se puede hacer más soluble la molécula por la adición de un grupo sulfonil.

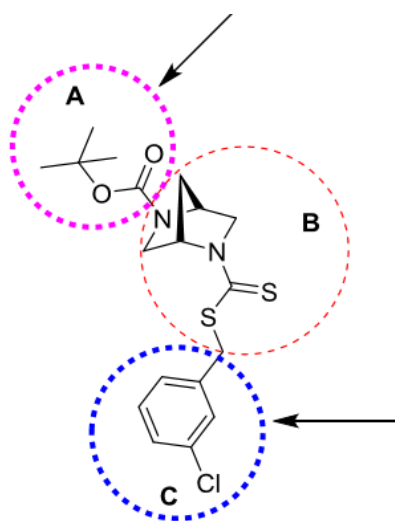


Figura 12. Compuesto SL-30 dividida en 3 segmentos

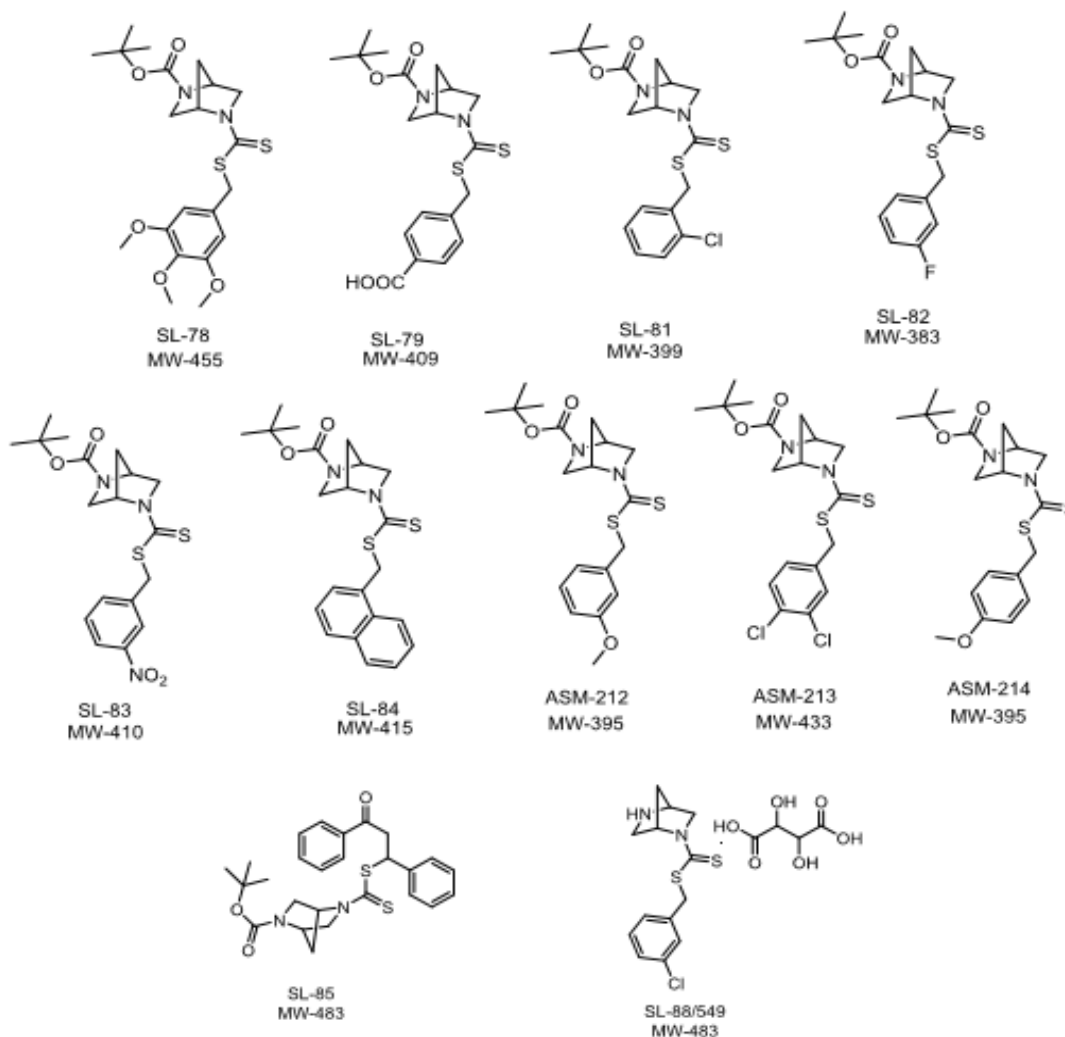


Figura 13. Estructura de los compuestos Ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano.

2.3. Posible mecanismo de acción.

Mediante el estudio Docking (acoplamiento molecular, permite estimar teóricamente la asociación ligando-proteína a nivel atómico lo que ayuda a caracterizar el comportamiento de la molécula en el sitio de unión de proteínas blanco);³³ se puede decir que el posible mecanismo de acción de estos compuestos es mediante la inhibición de formación de tubulina. La tubulina es una proteína esencial en células

eucariotas que consta de dos subunidades (α y β) (figura 14A). Los dímeros se juntan para formar hebras (protofilamentos) (figura 14B) y estas a su vez forman los microtúbulos (figura 14C) que forman el citoesqueleto y el huso acromático. Participan en la multiplicación y el movimiento celular.

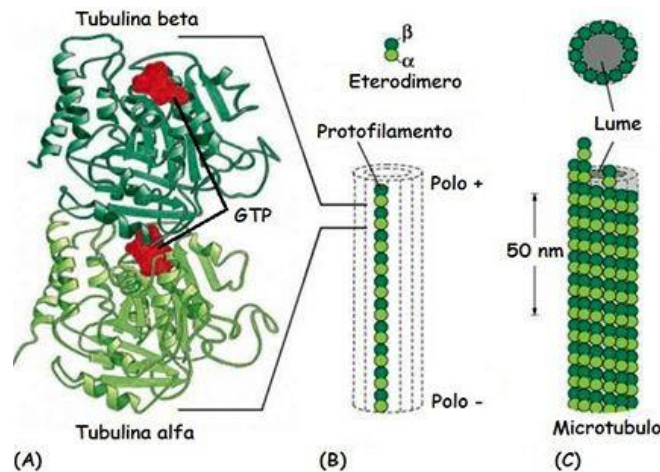


Figura 14. Formación de los microtúbulos unidad estructural del citoesqueleto en las células eucariotas. ³⁴

Ciertos fármacos antineoplásicos que se unen a los extremos (+) de la tubulina o a lo largo de su estructura, ya sea impidiendo o favoreciendo la polimerización de los microtúbulos, inhiben su formación o su funcionamiento al bloquear la división celular; estos son llamados antimetabólicos. ³⁴

3. Ciclo celular

El ciclo celular es el proceso a través del cual las células se multiplican o proliferan. Su correcta ejecución en un organismo pluricelular contribuye a establecer en él una integración estructural y funcional adecuada para hacer frente a las condiciones impuestas por el ambiente. Corresponde a las cinasas dependientes de ciclinas

(CDK) y sus subunidades activadoras, las ciclinas, dirigir el recorrido de las células por las fases del ciclo celular G_1 , S, G_2 y M. ³⁵ Las cinasas dependientes de ciclinas CDK, e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas CDK1, participan activando e inactivando las reacciones de fosforilación sobre proteínas específicas. Estas reacciones regulan las rutas bioquímicas o puntos de control que controlan las señales inhibitorias mitogénicas y de crecimiento, y coordinan la secuencia de transiciones del ciclo celular. Las ciclinas actúan como reguladores positivos de la actividad de las CDK, ya que esta actividad depende de su unión con la ciclina apropiada. Los CDK1 actúan como reguladores negativos de esa actividad. ³⁶

El ciclo celular ocurre a través de 4 distintas fases. G_1 , S, G_2 y M (Figura 15). En la fase G_1 , las células aumentan su volumen intracelular. La fase S implica la duplicación del material genético, mientras que en la fase G_2 hay un aumento en el tamaño de la célula. Finalmente, la fase M, la célula reparte los cromosomas duplicados dando lugar a las dos células hijas. ³⁷ Estas fases se pueden observar fácilmente en histogramas que se crean mediante la técnica de citometría de flujo exponiendo a las células al indicador fluorescente yoduro de propidio (IP).

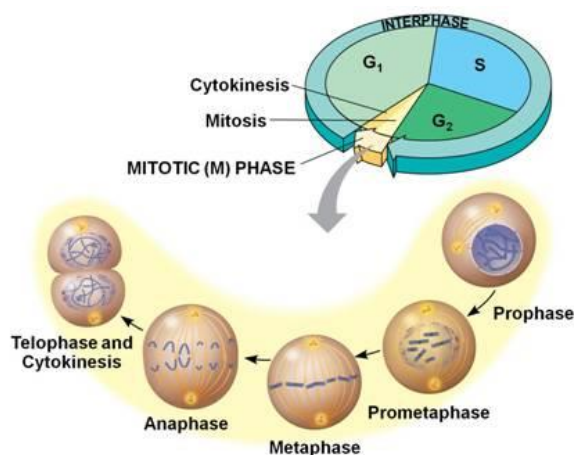


Figura 15. Fases del ciclo celular. ³⁸

4. Muerte celular

La muerte celular se produce por dos mecanismos principales:

4.1. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso activo por el que las células son eliminadas del organismo. La activación de la vía apoptótica en las células con lesión del ADN minimiza el riesgo de crecimiento de células mutadas o transformadas. Las células apoptóticas poseen un aspecto característico que implica la condensación cromosómica y la fragmentación nuclear, disminución de tamaño celular y la formación de cuerpos apoptóticos que contienen partes de la cromatina rodeadas de membrana celular. Estos cuerpos son fagocitados por las células vecinas produciéndose una pequeña inflamación.

El proceso de apoptosis celular puede desencadenarse por diferentes estímulos, incluido el desequilibrio de las señales de crecimiento y el daño de la membrana celular o del ADN. Tras la afectación del ADN como consecuencia del estrés oxidativo del tratamiento con determinados fármacos o con radioterapia, la inducción de la apoptosis implica el aumento de expresión de la proteína p53. Los mecanismos moleculares que controlan el proceso de apoptosis celular no se conocen del todo, pero los principales efectores del mismo son una serie de cisteinoproteasas, denominadas caspasas, que se activan mediante la división de precursores moleculares y actúan rompiendo sustratos específicos clave en las rutas apoptóticas.³⁶ Un ensayo que se emplea normalmente para cuantificar células muertas es mediante citometría de flujo usando el marcador de Anexina V y 7 AAD.

Como se mencionó uno de los mecanismos mediante el cual se lleva a cabo la muerte celular es por el daño que causa el estrés oxidativo. El metabolismo oxidativo se da en la mitocondria, esta es considerada como la principal fuente de radicales libres, ya que al producirse el metabolismo oxidativo se da la reducción del oxígeno, formando durante estas reacciones una serie de intermediarios tóxicos llamadas especies reactivas de oxígeno o ROS (O_2^- , H_2O_2 y OH^-). La célula normal produce cierta cantidad de ROS, sin embargo las células generan antioxidantes para disminuir los niveles intracelulares de radicales libres. Pese a esto, cuando los niveles de ROS se elevan pueden generar estrés oxidativo. Existen factores exógenos que incrementan las especies reactivas tales como; exposición a rayos X, tabaco, contaminantes del aire, productos químicos industriales y ciertos medicamentos que trae como consecuencia daños celulares irreparables, incluso la muerte celular (figura 16).³⁹

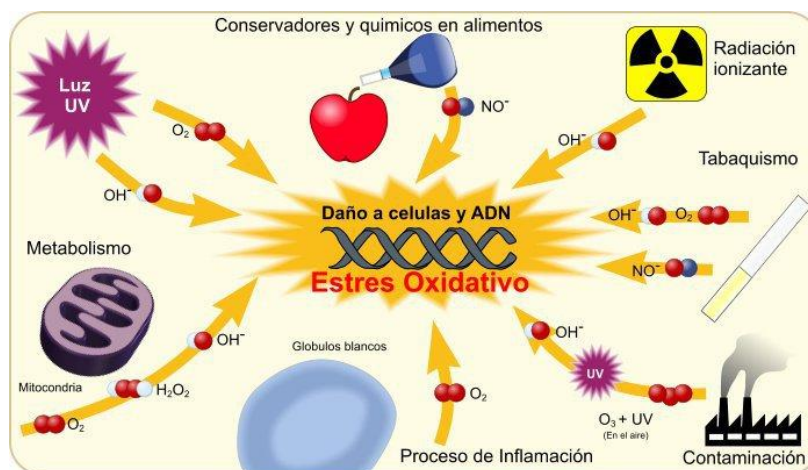


Figura 16. Factores externos que incrementan ROS.

Se han detectado tasas elevadas de ROS en casi todos los cánceres, donde promueven muchos aspectos del desarrollo y progresión del tumor. El aumento desproporcional de ROS intracelular puede inducir la detención del ciclo celular del cáncer, la senescencia y la apoptosis. Esto se puede lograr con la quimioterapia contra el cáncer, el agotamiento de las células de las proteínas antioxidantes o la generación de ROS por las células inmunes. La apoptosis está relacionada con un aumento del estrés oxidativo mitocondrial que causa la liberación del citocromo C, un evento irrevocable que conduce a la activación de las caspasas y la muerte celular.⁴⁰ La cantidad liberada de especies reactivas de oxígeno se puede cuantificar mediante el uso del citómetro de flujo empleando el reactivo Carboxy-H2DCFDA indicador de estrés oxidativo.

4.2. Necrosis

Respuesta pasiva al daño celular por la que las células se hinchan y se lisan, liberando su contenido al espacio intersticial, lo que puede desencadenar una respuesta inflamatoria.³⁶

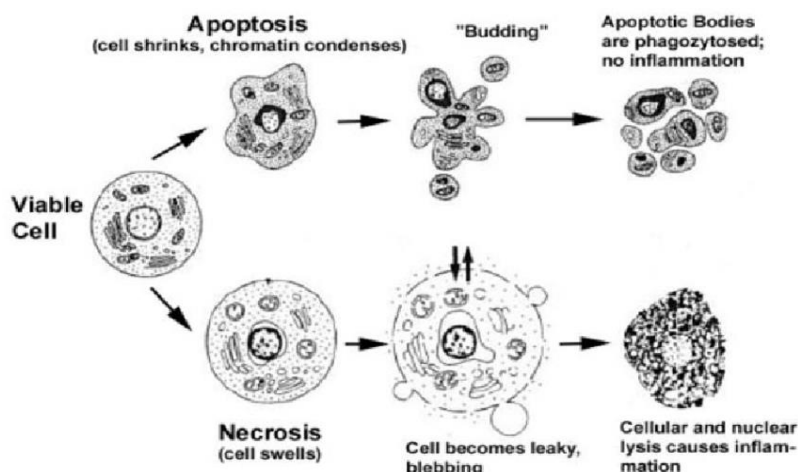


Figura 17. Esquema del proceso de apoptosis y necrosis de la célula.
ResearchGate.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es un problema prioritario de salud pública en México. Los tumores malignos exigen cada vez más y mayores recursos hospitalarios, mejora de tecnologías en el diagnóstico temprano y tratamientos cada vez más costosos. A pesar de grandes avances en los últimos 100 años; en muchas áreas de la medicina moderna, el éxito del tratamiento del cáncer sigue siendo un reto importante, el uso de quimioterapia tradicional contra el cáncer es todavía muy limitado debido al difícil desarrollo de agentes que selectivamente eliminen células tumorales o inhiban su proliferación sin la toxicidad sistémica.

Recientemente se ha descrito el diseño de nuevas moléculas que incluyen el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano unido al grupo ditiocarbamato, sin embargo a la fecha se desconoce su potencial actividad citotóxica.

Por lo que en el presente trabajo se evaluó la citotoxicidad y los mecanismos de apoptosis, producción de especies reactivas y ciclo celular después de la exposición de los compuestos en líneas celulares de cáncer cérvico-uterino (HeLa, CaSki y SiHa).

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos ditiocarbamatos híbridos que incorporan el sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano presentarán un efecto citotóxico a través de los mecanismos de apoptosis, generación de especies reactivas y arresto celular en líneas celulares de CaCu.

V. OBJETIVOS

1. **General:**

- ✓ Determinar el efecto citotóxico, de los compuestos Ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano, en tres líneas celulares de cáncer cérvico-uterino.

1.1. **Particulares:**

- ✓ Determinar concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) de los compuestos Ditiocarbamatos híbridos, en la línea celular de CaCu (HeLa).
- ✓ Calcular la CI_{50} de los compuestos más activos, en las líneas celulares de CaCu, (HeLa, SiHa y CaSki).
- ✓ Evaluar el efecto apoptótico, ROS y el arresto celular después de la exposición al compuesto más activo en las tres líneas celulares.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. *Material*

- Compuestos a evaluar.

Los compuestos fueron otorgados por el Dr. Ignacio Regla Contreras y sintetizados por el Dr. Sujey Laskar en el laboratorio 9 de Química Orgánica piso 2 de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ). Los cuales fueron nombrados con la siguiente nomenclatura.

SL-78, SL-79, SL-81, SL-82, SL-83, SL-84, SL-85, SL-88, ASM-212, ASM-213, ASM-214.

- Material de cultivo celular (cajas, placas de 96 pozos, pipetas, puntas, tubos, etc.)
- Material de cristalería. (vasos de precipitado, pipetas, probetas, matraz aforado)
- Líneas celulares: HeLa, CaSki y SiHa (cáncer de cérvix). Obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC).

1.1. **Reactivos**

- Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 10% suero fetal de bovino
- Bicarbonato sódico para cultivo
- Tripsina (Invitrogen)
- PBS (Solución buffer de fosfatos)
- PBS + EDTA
- Cristal violeta 0.1%
- Formol 10%
- Ácido acético 33%
- DMSO para cultivo (Dimetil Sulfóxido)
- Etanol para cultivo
- Cisplatino CDDP (Sigma Aldrich)
- XTT (3-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis(4-metoxi-6-nitro) - disulfonato de benceno) (Roche)
- Carboxy-H2DCFDA
- Annexina (Millipore)

1.2. **Equipos**

- Balanza analítica.
- Campana de flujo laminar (Steril Gard III. Advance)
- Microscopio invertido
- Lector de ELISA
- Campana de extracción
- Centrífuga
- Vortex

2. Métodos

2.1. Cultivo de células

Las células HeLa, CaSki y SiHa fueron mantenidas en cajas de cultivo de 75cm² con 10mL de medio de cultivo DMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino e incubadas a 37°C bajo una atmosfera con 5% de CO₂.

2.2. Sembrado de células

Las células mantenidas en DMEM fueron tripsinizados durante 5 min a 37°C. La tripsina es una enzima proteolítica que actúa degradando las proteínas que sirven de unión entre las células del tejido y las libera en suspensión, separándolas entre ellas y de la caja de cultivo. Una vez tripsinizadas, la reacción se neutralizó agregando medio de cultivo para eliminar el efecto de la tripsina, las células se recolectaron en un tubo de cultivo y se centrifugaron a 1500 rpm durante 8 minutos. Las células se resuspendieron y se contaron con ayuda de un hematocitómetro y/o con ayuda del Cell Counter utilizando el método de azul tripano. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1x10⁴ cel/pozo, después de 24 h las células fueron expuestas a cada uno de los compuestos.

2.3. Exposición.

Para determinar la citotoxicidad de cada uno de los compuestos se realizaron curvas de concentración-respuesta en cada línea celular. Se obtuvieron las concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀), de cada compuesto, con ayuda del Software Sigma Plot.

Para la exposición de los compuestos, se utilizaron soluciones stock de 20 mg/mL y a partir de estas soluciones stock las células fueron expuestas a diferentes concentraciones (0 a 500 μ M) de cada compuesto por 48 y 72 h. Después de la exposición se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo de XTT y como método complementario se realiza el ensayo con cristal violeta. Los resultados fueron comparados con el efecto citotóxico del cisplatino, el cual es utilizado como terapia de primera línea en cáncer cérvico-uterino.

2.4. Ensayo de viabilidad celular mediante XTT

Después del periodo de incubación, la viabilidad celular fue determinada utilizando el ensayo XTT, el cual es una sal de tetrazolio (3-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis(4-metoxy-6-nitro) –disulfonato de benceno) que se transforma en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, que se evalúa mediante medidas de absorbancia en un espectrofotómetro, está relacionada con el número de células viables, es decir, el número de células metabólicamente activas. El reactivo XTT se utiliza por 1 h. Pasado ese tiempo se procedió a medir la absorbancia a 492 nm y 690 nm en un lector de placa Multiskan (Fisher Scientific).

2.5. Ensayo de viabilidad celular con Cristal Violeta (CV)

Después del periodo de incubación las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formol al 10%, posteriormente las células fueron teñidas con el colorante

cristal violeta por 2 h, y al final se disolvió el color con ácido acético y la absorbancia se midió a 570 nm en un lector de placa.

Los datos de absorbancias se expresaron como porcentaje de la viabilidad celular en función de concentraciones crecientes de cada compuesto, tomando el 100% de viabilidad al promedio de las absorbancias del control y a partir de las curvas de concentración-efecto se determinó la CI_{50} de cada compuesto.

Después de seleccionar el compuesto con mayor actividad, se evaluó el grado de apoptosis. Para esto las células de cada línea celular fueron expuestas a la CI_{50} del compuesto SL-78. La evaluación de la apoptosis se realizó 72 h después de la exposición.

2.6. Ensayo de apoptosis mediante citometría de flujo usando Anexina V y 7AAD

Durante el proceso de apoptosis, inicialmente ocurren modificaciones en la membrana celular, entre ellas, cambios en la distribución de fosfolípidos. La fosfatidilserina (FS) es un fosfolípido que normalmente se encuentra en la membrana interna de las células sanas; sin embargo, es externalizada debido a un estímulo proapoptótico, por lo tanto, se utiliza como marcador de apoptosis temprana. La expresión de FS fue detectada usando Anexina V, una proteína que presenta gran afinidad por la FS. En contraste la apoptosis tardía fue determinada con el compuesto 7-Amino-Actinomicina D (7AAD), que se intercala en los fragmentos de DNA de las células que carecen de integridad de la membrana.

La cantidad de células requeridas para realizar el ensayo fueron 1×10^5 , las cuales fueron teñidas con 100 μl del marcador Anexina V y 7 AAD (Merck Millipore), posteriormente se incuban 20 min en la oscuridad para su posterior lectura de la fluorescencia en un citómetro de flujo (Guava EasyCyte Flow, Millipore), con una adquisición de 1×10^4 eventos. Las células fueron clasificadas como se muestra en la figura 18: células viables (A), apoptosis temprana (B) y apoptosis tardía (C).

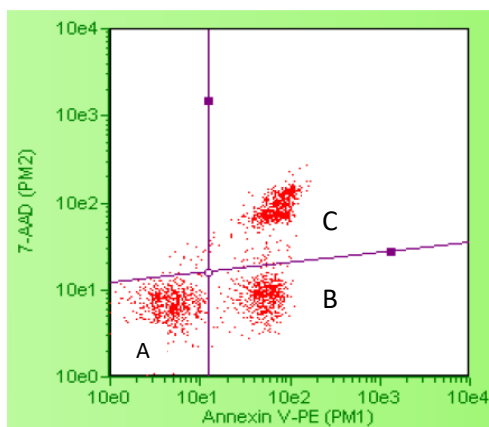


Figura 18. Diferencias entre etapas de apoptosis en una población celular

2.7. Ensayo ROS

La cuantificación de ROS se realizó utilizando el reactivo Carboxy-H₂DCFDA, indicador de estrés oxidativo, el reactivo no es fluorescente sin embargo, al entrar al citoplasma celular y, en presencia de ROS, principalmente peróxido, es oxidada a su forma fluorescente. Por lo tanto, el nivel de oxidación, generada por ROS, fue determinado como el incremento en la fluorescencia de Carboxy-H₂DCFDA.

Después del tratamiento se obtuvieron 1×10^5 células teñidas con 100 μL del reactivo Carboxy-H₂DCFDA e incubadas durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, para su posterior lectura de la fluorescencia en un citómetro de flujo (Guava EasyCyte Flow, Millipore) utilizando el programa InCyte.

2.8. Ciclo celular

Utilizando la técnica de Citometría de flujo, las células previamente fijadas con etanol al 70% se permeabilizan y se exponen al yoduro de propidio (IP) un indicador fluorescente que se intercala y reacciona con el DNA celular. Por lo tanto, una célula en estado G₁ emitirá menor fluorescencia del IP que una célula en fase S.

Después del tratamiento, se obtuvieron 2×10^5 células y las células se resuspendieron en 500 μ L de PBS y se mezclaron con 5 mL de etanol al 70%. Se incubaron a -20°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se centrifugaron, se lavaron con PBS. Nuevamente se centrifugaron eliminando el sobrenadante y se resuspendieron con 200 μ L de Guava Cell Cycle Reagent, se incubaron 30 min en la oscuridad para su posterior lectura de la fluorescencia en un citómetro de flujo (Guava easyCyte Flow, Millipore).

2.9. Análisis estadístico.

Para determinar la significancia estadística entre el tratado y el grupo control, se realizó una t-Student. Se utilizó el programa SigmaStat y un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

VII. RESULTADOS

1. Efecto citotóxico de los compuestos ditiocarbamatos derivados del sistema DBH heptano en las líneas celulares de CaCu.

Con la finalidad de determinar el efecto citotóxico, se evaluaron los compuestos en la línea celular HeLa sensible a Cis-Pt posteriormente se compara su actividad para su clasificación. En la Tabla 1 se observan los valores de la Cl_{50} de los compuestos evaluados en la línea celular HeLa, los compuestos más activos en esta línea celular fueron: SL-78, SL-81 y SL-83. Posteriormente estos fueron evaluados en las dos líneas celulares restantes (CaSki y SiHa). En la figura 19 y 20 se muestran las gráficas de viabilidad celular en las tres líneas celulares, después de la exposición a CDDP y los compuestos más activos respectivamente.

COMPUESTO	48 h. Cl_{50} $\mu\text{M} \pm \text{E.E}$	72 h. Cl_{50} $\mu\text{M} \pm \text{E.E}$
SL-78	1.13 \pm 0.2	1.15 \pm 0.07
SL-79	185.5 \pm 4	91 \pm 11
SL-81	6.1 \pm 0.8	4.2 \pm 1.4
SL-82	23.4 \pm 5	6.4 \pm 1
SL-83	3.9 \pm 0.4	5.1 \pm 0.6
SL-84	16.1 \pm 0.5	12.3 \pm 2.3
SL-85	33.8 \pm 1.7	20.4 \pm 3.9
SL-88	58.5 \pm 5.8	50.7 \pm 0.5
ASM-212	15.1 \pm 2.6	7 \pm 2.6
ASM-213	9.1 \pm 2.2	5.8 \pm 0.5
ASM-214	7.01 \pm 2.7	3.2 \pm 0.6

Tabla 1. Cl_{50} de cada compuesto evaluado en células HeLa a 48 y 72 H. Se muestra la media de tres a cuatro experimentos independientes por cuatruplicado. \pm E.E

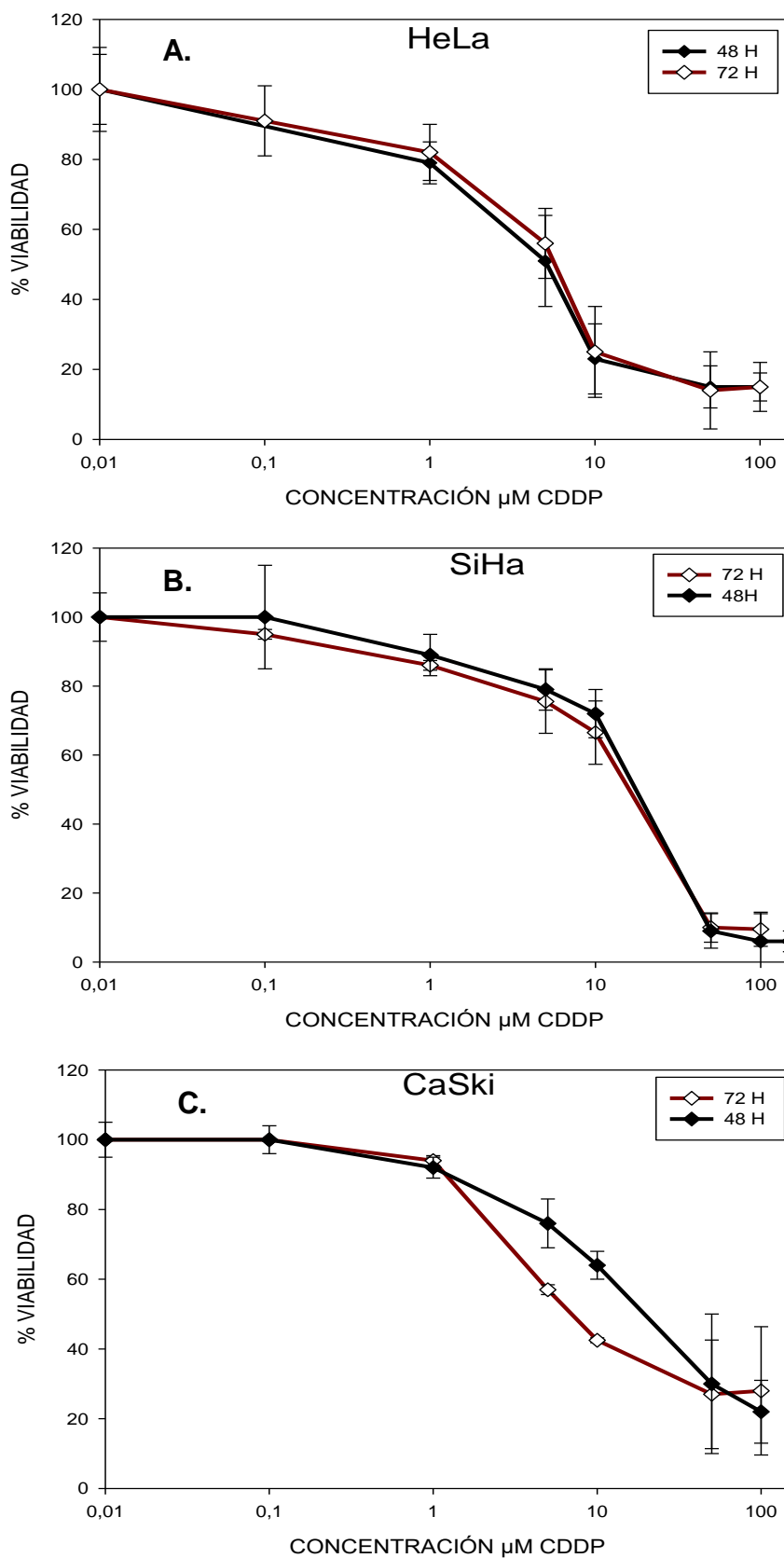
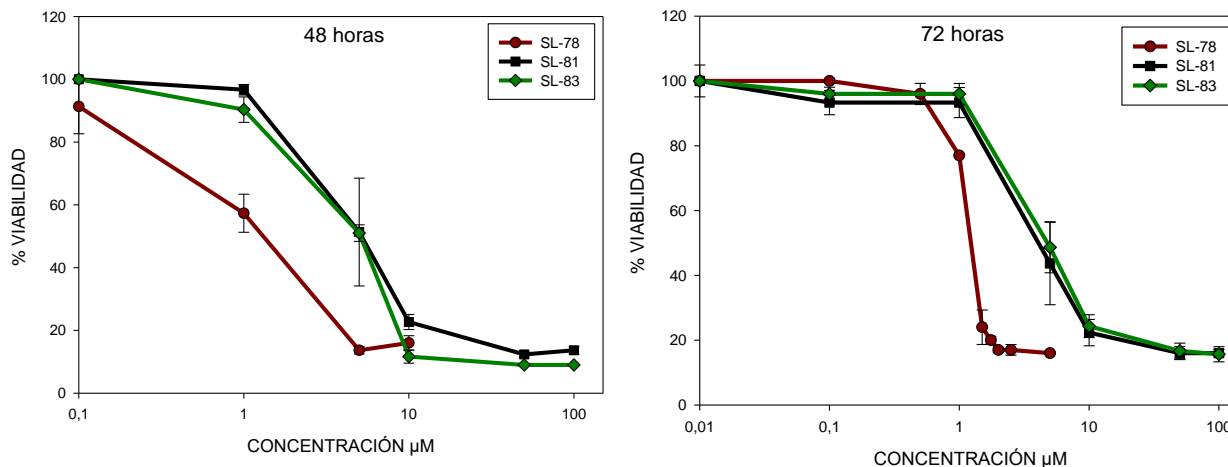
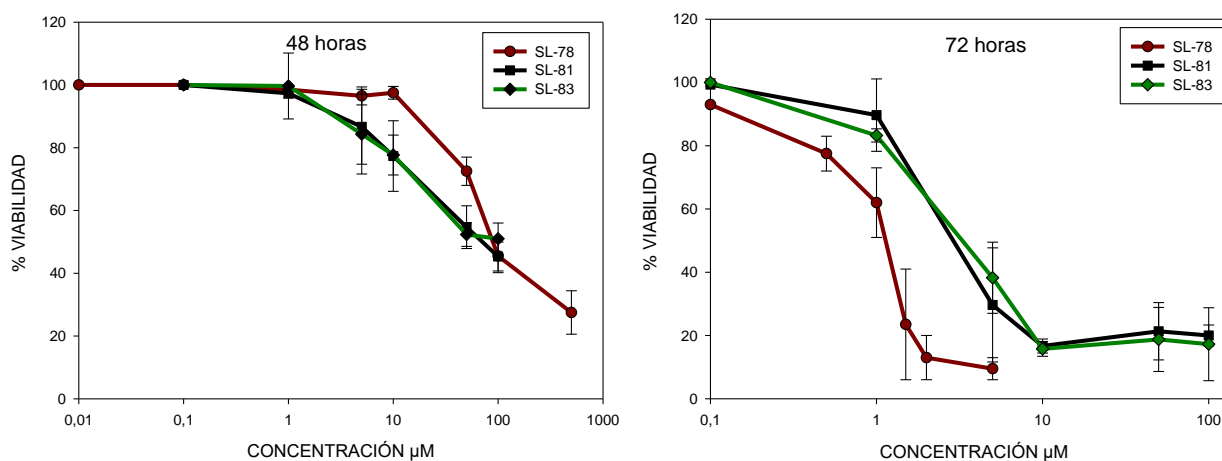


Figura 19. Efecto de CDDP sobre la viabilidad celular en HeLa (A), SiHa (B) y CaSki (C), después de 48 y 72 horas. Cada punto representa el promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

A. HeLa



B. SiHa



C. CaSki

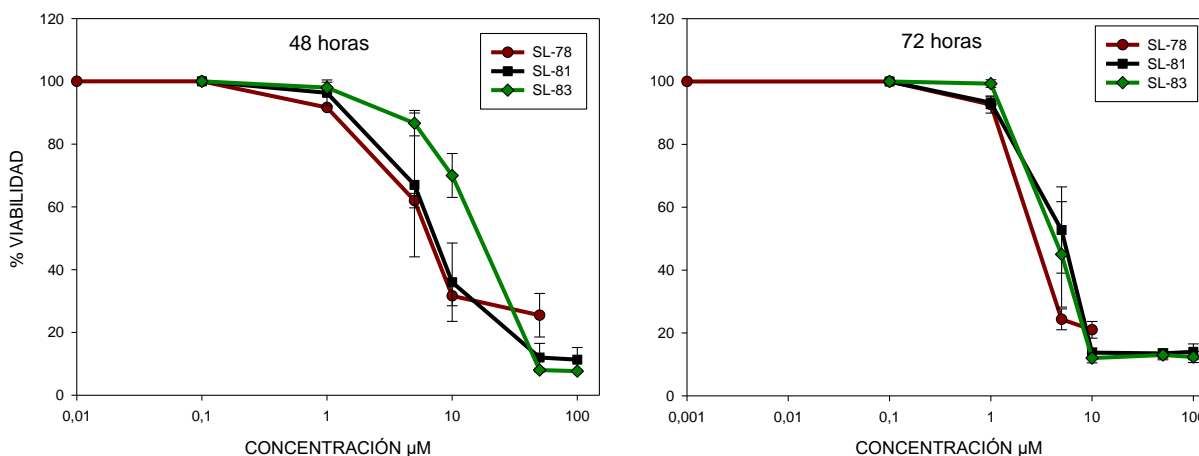


Figura 20. Efecto de los compuestos más activos sobre la viabilidad celular después de 48 y 72 horas. Cada punto representa el promedio \pm E.E de tres experimentos independientes.

A partir de los datos generados en las curvas de concentración-respuesta de los compuestos más activos y del control (Cisplatino), se obtuvo la CI_{50} , que se presenta en las siguientes tablas.

HeLa			SiHa		
HORAS	48 h	72 h	HORAS	48 h	72 h
COMPUESTO	$CI_{50} \mu M \pm DS$	$CI_{50} \mu M \pm DS$	COMPUESTO	$CI_{50} \mu M \pm DS$	$CI_{50} \mu M \pm DS$
CDDP	4.8 ± 0.28	5.2 ± 0.28	CDDP	12.8 ± 3.2	15 ± 3.5
SL-78	1.13 ± 0.5	1.15 ± 0.07	SL-78	90.3 ± 23.2	1.07 ± 0.05
SL-81	6.1 ± 0.8	4.2 ± 1.4	SL-81	68.07 ± 25.05	3.39 ± 1.75
SL-83	3.9 ± 0	5.1 ± 0.6	SL-83	58.55 ± 2.7	3.21 ± 0.94

CaSki		
HORAS	48 h	72 h
COMPUESTO	$CI_{50} \mu M \pm DS$	$CI_{50} \mu M \pm DS$
CDDP	16.23 ± 2.6	6.2 ± 0.3
SL-78	6.37 ± 0.6	2.4 ± 1.46
SL-81	6.77 ± 3.93	5.77 ± 0.47
SL-83	13.83 ± 3.67	5.17 ± 0.75

Tabla 2. CI_{50} de los compuestos más activos y CDDP evaluados en las líneas celulares de CaCu

2. Morfología celular

En la Figura 21 se presentan los cambios morfológicos y la disminución de la proliferación en las células HeLa, SiHa y CaSki expuestas a la CI_{50} del compuesto SL-78.

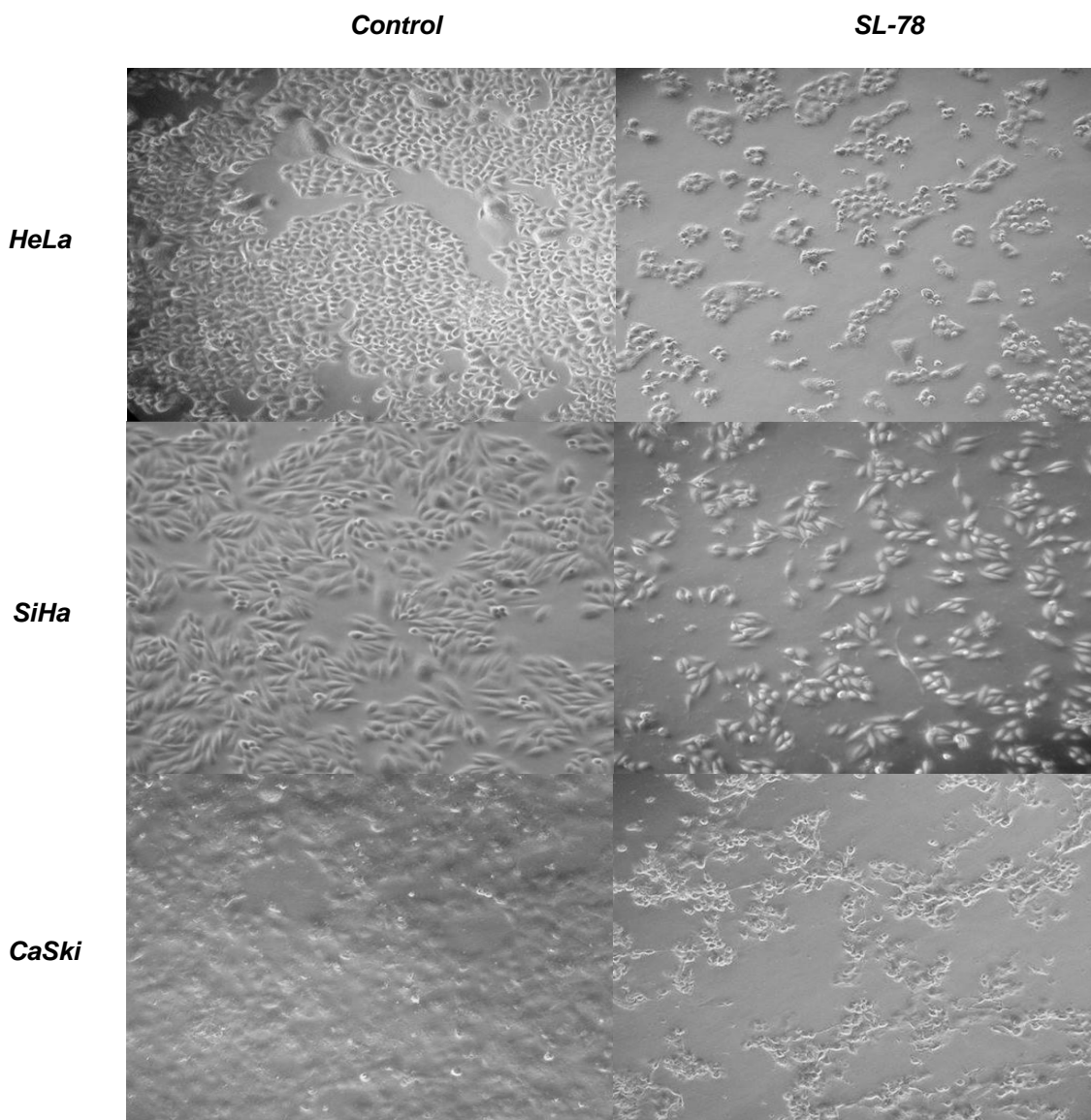


Figura 21. Morfología de las células de CaCu después de 72 h de exposición del compuesto SL-78. Los grupos controles fueron expuestos únicamente al vehículo.

3. Evaluación de la inducción de apoptosis después del tratamiento con el compuesto SL-78.

Con el objetivo de determinar el efecto apoptótico, se evaluó el tipo de muerte celular por citometría de flujo a través de la tinción de Anexina V y 7-AAD en células HeLa, SiHa y CaSki. La clasificación de las poblaciones se realizó con el Guava Nexin Software. En las Figuras 22, 23 y 24 se presentan la distribución de la población celular al final del tratamiento con el compuesto SL-78,

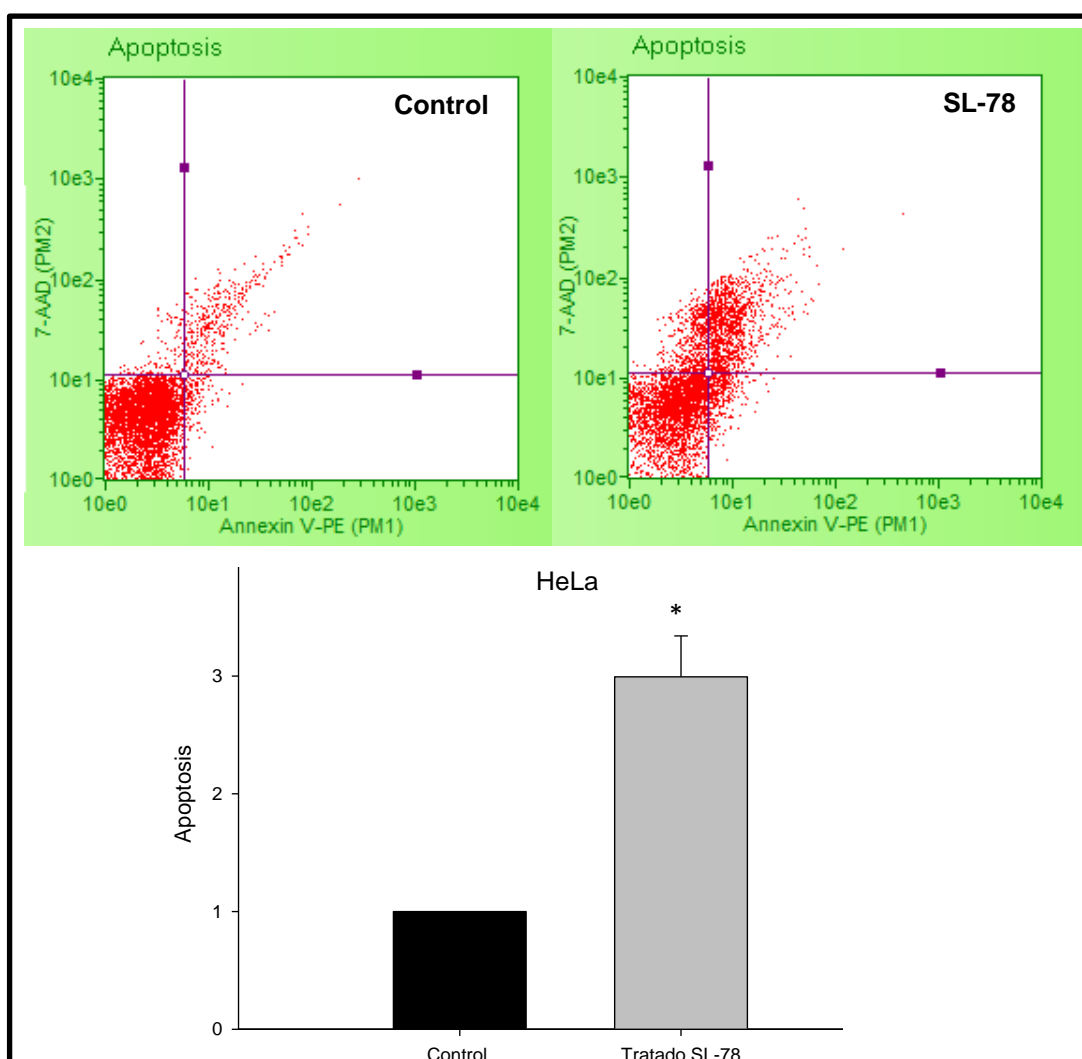


Figura 22. Dot Plots representativos de apoptosis de las células HeLa control y tratadas con el compuesto SL-78. Las gráficas de barras indican el valor normalizado de células apoptóticas. $n = 2 \pm DS$; * $p < 0.05$ (t-Student)

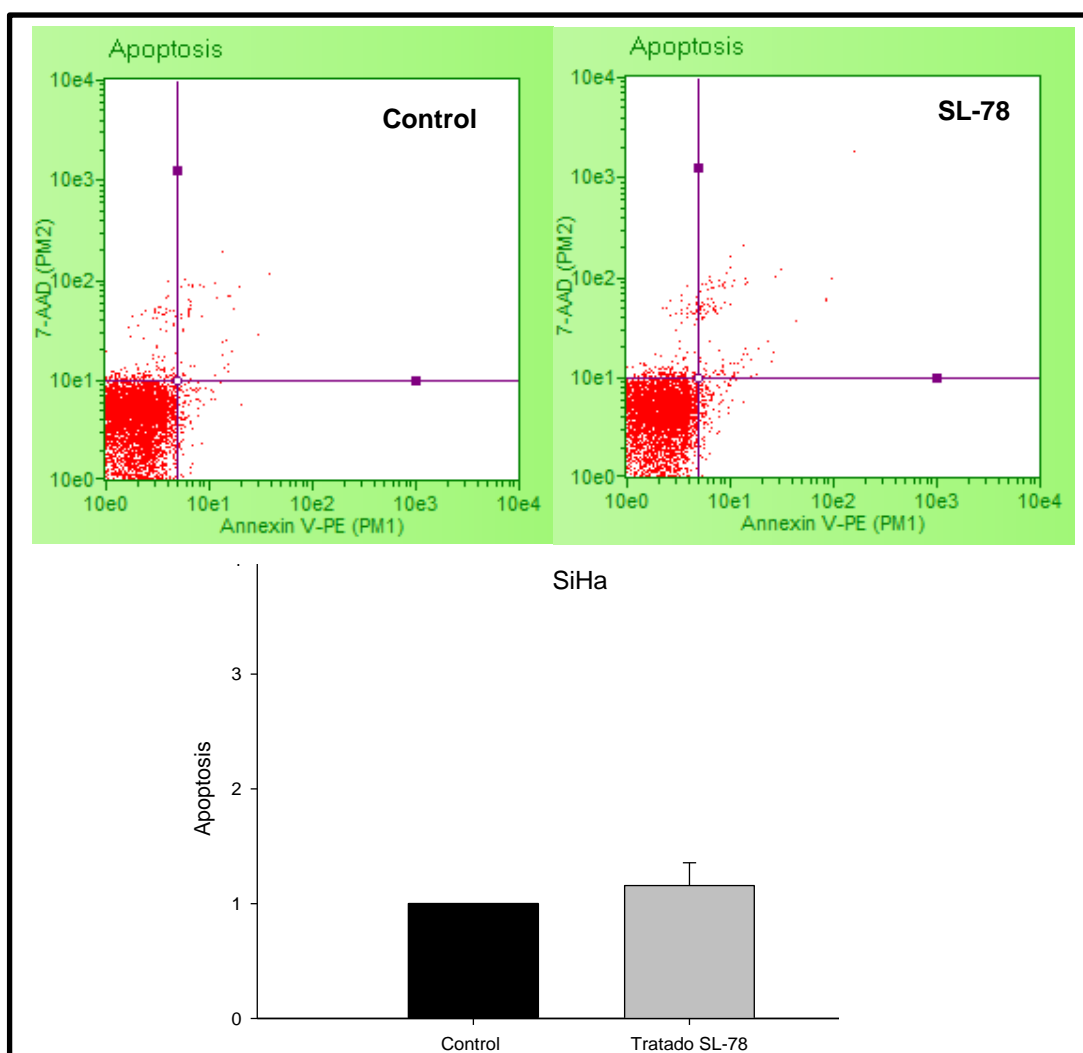


Figura 23. Dot Plots representativos de apoptosis de las células SiHa control y tratadas. Las gráficas de barras indican el valor normalizado de células apoptóticas. $n = 2 \pm DS$

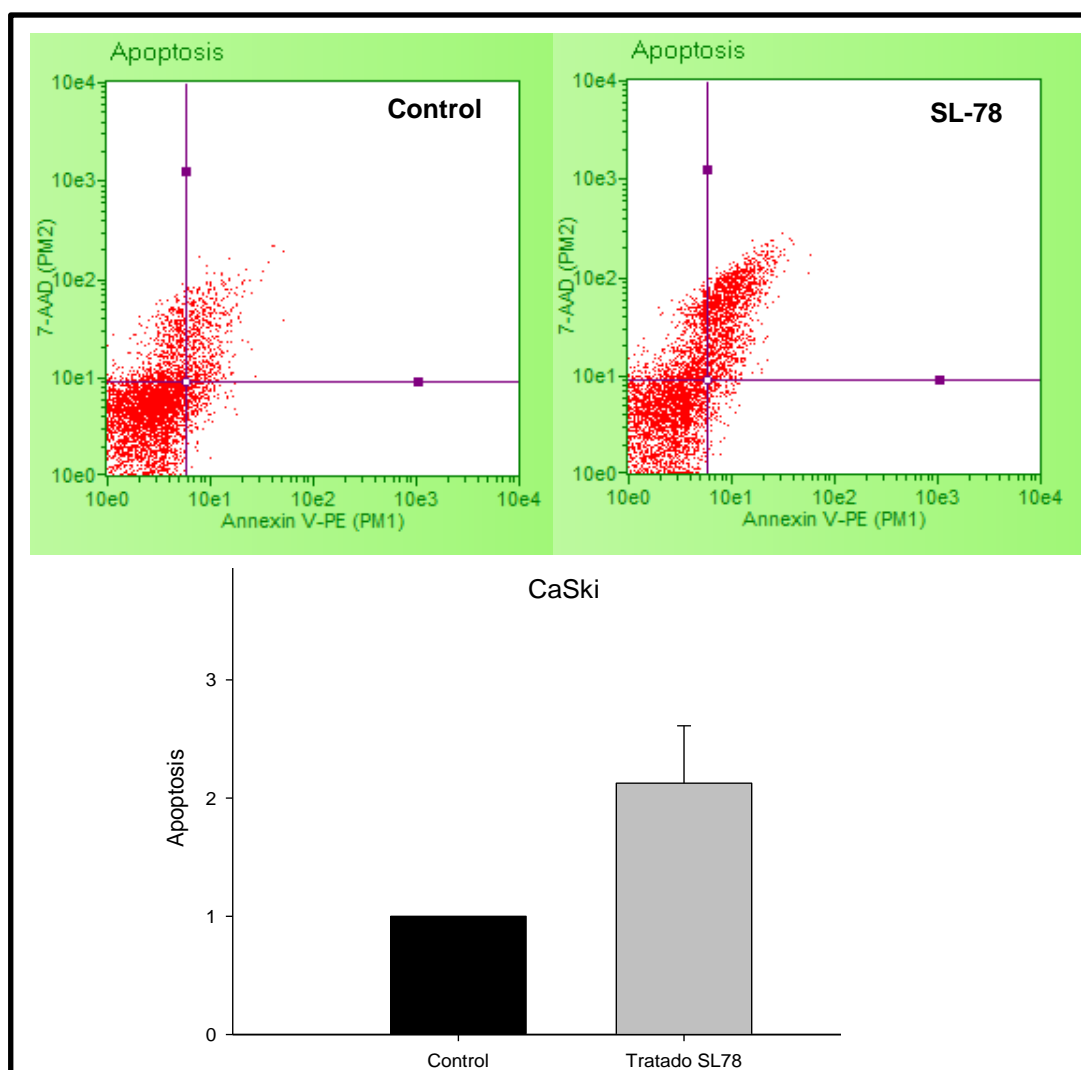


Figura 24. Dot Plots representativos de apoptosis de las células CaSki control y tratadas con el compuesto SL-78. Las gráficas de barras indican el valor normalizado de células apoptóticas. $n = 2 \pm DS$

4. Efecto del compuesto SL-78 en la generación de ROS.

Para determinar si el compuesto SL-78 reactiva la función mitocondrial, se cuantificó la producción de ROS mediante la fluorescencia emitida por Carboxy-H2DCFDA oxidada en las células después de 72 horas de exposición a la Cl_{50} en las tres líneas celulares. En la Figura 25 se observan las curvas que se obtuvieron de la Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF) utilizando el programa InCyte (Millipore, Inc)

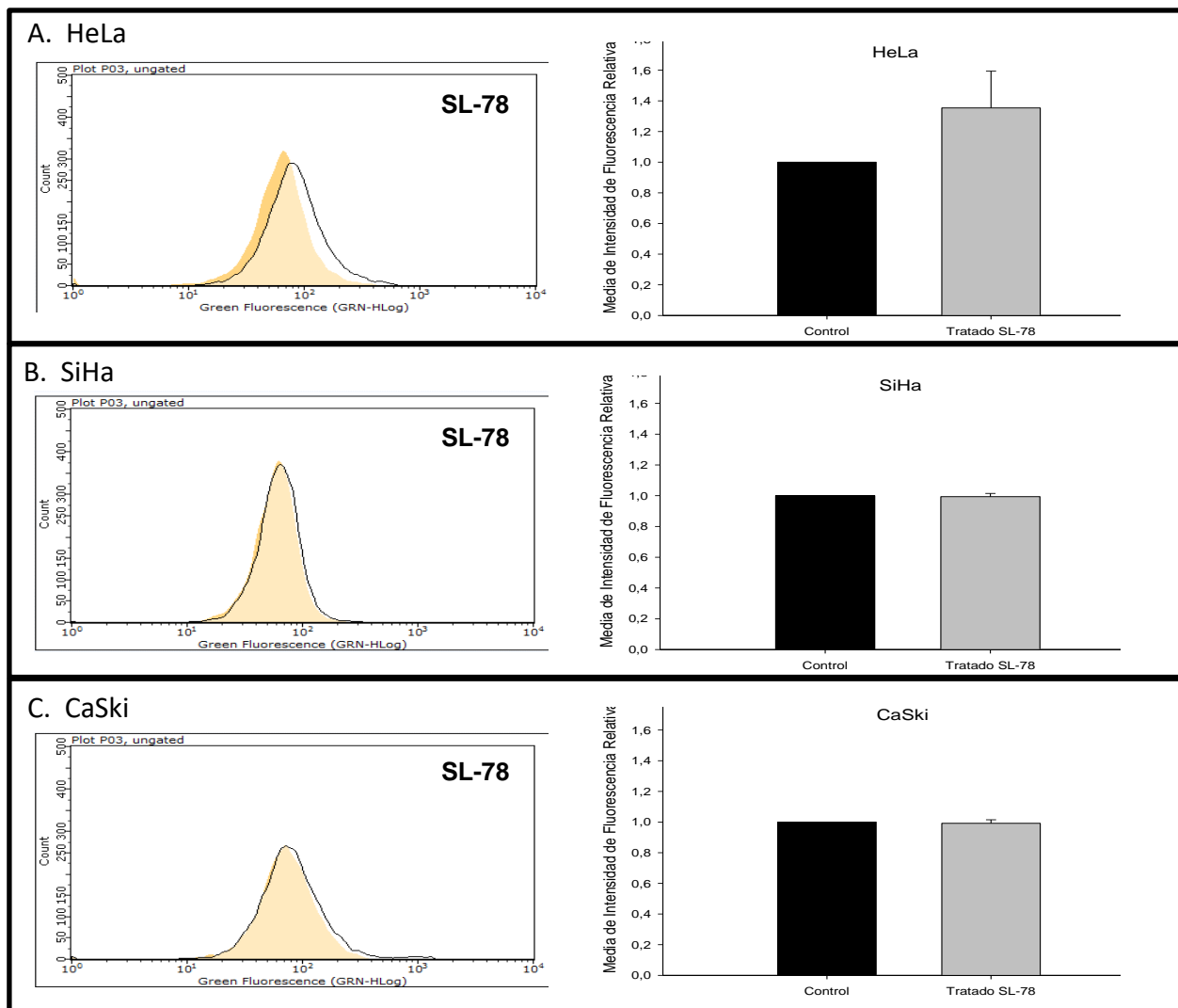


Figura 25. Curvas representativas de la intensidad de fluorescencia del control (amarillo) y tratado (blanco). Las gráficas de barras indican el valor normalizado. $n=2 \pm DS$

5. Evaluación de Ciclo Celular.

Con la finalidad de poder determinar si el compuesto SL-78 tiene un efecto sobre el arresto celular, se cuantificó la cantidad de DNA de cada fase del ciclo celular, mediante yoduro de propidio (IP). Se aplicó la CI_{50} del compuesto y la evaluación del arresto celular se realizó 72 horas después de la exposición en las tres líneas celulares. En las Figuras 26, 27 y 28 se presentan los histogramas generados por el programa Guava Cell Cycle (Millipore Inc.,).

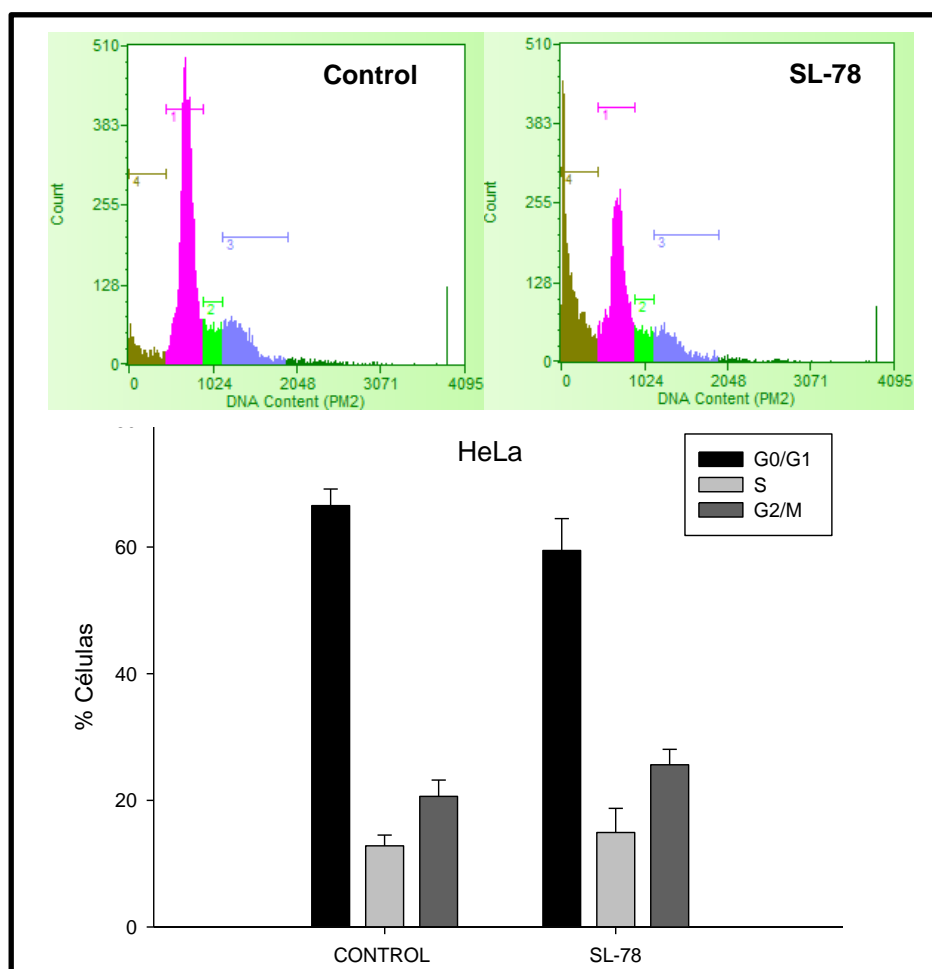


Figura 26. Histogramas representativos del ciclo celular de las células HeLa, tratadas con el compuesto SL-78 durante 72 horas. Las gráficas de barras indican el valor porcentual de células en cada ciclo. $n = 3 \pm DS$.

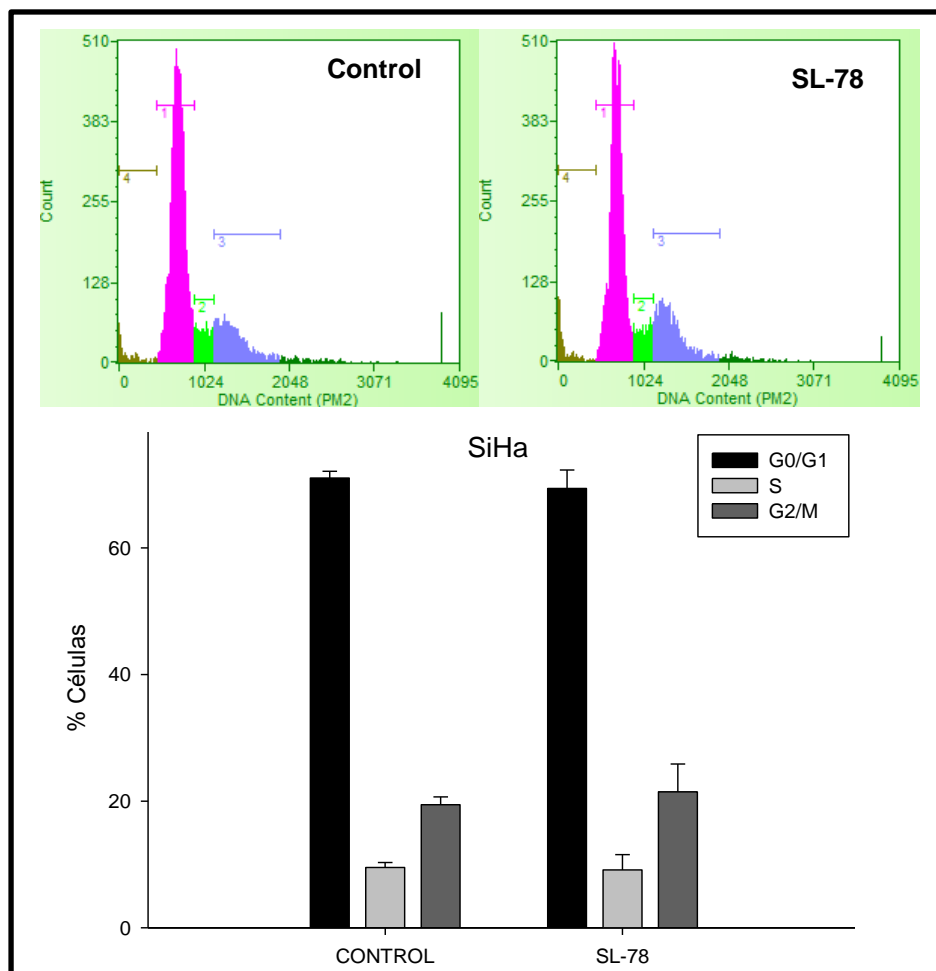


Figura 27. Histogramas representativos del ciclo celular de las células SiHa, tratadas con el compuesto SL-78 durante 72 horas. Las gráficas de barras indican el valor porcentual de células en cada ciclo. $n = 3 \pm DS$.

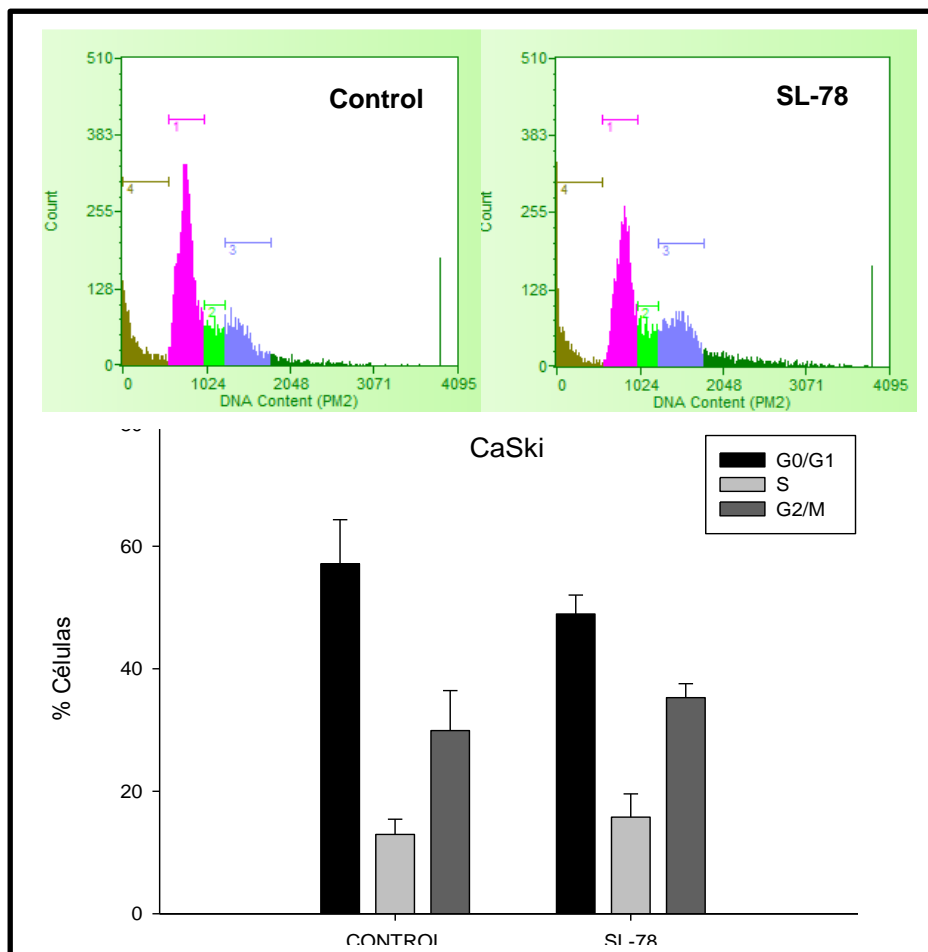


Figura 28. Histogramas representativos del ciclo celular de las células CaSki, tratadas con el compuesto SL-78 durante 72 horas. Las gráficas de barras indican el valor porcentual de células en cada ciclo. $n = 3 \pm DS$.

VIII. DISCUSIÓN

La quimioterapia a base de cisplatino alcanza una respuesta completa en el 70-80% de los pacientes con tumores. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de pacientes en estadios tempranos tiene una respuesta al tratamiento convencional¹³. Estos resultados han motivado a la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos con mayores efectos terapéuticos. Las pruebas de quimiosensibilidad *in vitro* son las herramientas más usadas para evaluar la actividad de nuevos compuestos.

En el presente trabajo, utilizando ensayos *In vitro*, se logró observar la actividad citotóxica sobre las células de cáncer cérvico-uterino de nuevos compuestos ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema DBH. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento y se obtuvieron gráficamente los valores de la CI_{50} (concentración del fármaco para lograr una inhibición del crecimiento del 50%) a partir de las curvas de viabilidad celular. Con las CI_{50} presentadas en la Tabla 1, podemos diferenciar a los compuestos que no tienen actividad ($CI_{50} > 100 \mu M$) como el compuesto SL-79, el cual posiblemente por la posición “*para*” del grupo carboxilo, dónde la interacción con el resto de la molécula no es favorable para el resto del compuesto. Por el contrario los compuestos que mostraron una mediana actividad ($CI_{50} < 100 \mu M$ y $> 10 \mu M$) fueron: SL-82, SL-84, SL-85, SL-88 y ASM-212; SL-88 es la sal libre del compuesto SL-30 (Figura 5), se esperaba que el compuesto tuviera un efecto citotóxico mayor que el resto de los compuestos, ya que es el único de los compuestos que se solubiliza en agua; sin embargo, los resultados no mostraron esto, por lo que se puede inferir que el grupo Boc, el cual fue removido, es el que

podría dar una mayor actividad y estabilidad al resto de la molécula. Los compuestos con mayor actividad ($CI_{50} < 10 \mu M$) fueron los siguientes: SL-78, SL-81, SL-83, ASM-213, ASM-214 mostraron una CI_{50} de $1.1 \mu M$, $4.2 \mu M$, $5.1 \mu M$, $5.8 \mu M$ y $3.2 \mu M$ a las 72 h respectivamente; estos compuestos tienen en común que su anillo aromático cuenta con sustituciones de grupos metoxi, cloro y nitro. Y de acuerdo a los antecedentes se sabe que lo que hace más activo un compuesto de otro es la posición en la que se encuentran estos grupos funcionales y la cantidad de sustituciones dentro del anillo. Se observa también que el compuesto SL-81 tiene un cloro en posición “*orto*”, esta posición se vio favorecida con respecto al SL-30 y SL-88 los cuales presentan el mismo sustituyente pero en diferente posición, observándose una mayor actividad del compuesto SL-81. De forma similar resultó con el compuesto ASM-213 que tiene una doble sustitución del halógeno cloro, este presentó una actividad aumentada a las 72 horas con respecto a las 48 horas. Si se comparan los compuestos ASM-212 y ASM-214 que tienen el mismo grupo metoxi en posición “*meta*” y “*para*” respectivamente, se observa claramente que en la posición “*para*” se ve mayormente favorecido con una CI_{50} $7 \mu M$ a las 48 horas y $3.2 \mu M$ a las 72 horas. Por último el compuesto que resultó ser el más activo fue el SL-78, tiene tres sustituyentes metoxi, por lo que existe una mayor interacción con el resto de la molécula, haciendo a este compuesto el más activo de los once compuestos evaluados.

Todos los compuestos fueron evaluados en la línea celular HeLa, y los compuestos que resultaron más activos fueron: SL-78, SL-81 y SL-83. Estos compuestos fueron

evaluados en las tres líneas celulares (HeLa, SiHa y CaSki), obteniendo la CI_{50} a las 48 y 72 horas, los resultados se muestran en la Tabla 2. Observando que los tres compuestos mostraron actividad desde las 48 h tanto en HeLa como en CaSki; sin embargo, SiHa mostró menos actividad a las 48 h, presentando una buena actividad solo a las 72 h. El compuesto SL-78 resultó ser el más activo a los dos tiempos de exposición, aun cuando los resultados se compararon con el CDDP el cual resultó ser menos activo que los compuestos evaluados.

Las tres líneas utilizadas en este trabajo tienen diferentes características, por ejemplo: CaSki y SiHa tienen integrado en su genoma al VPH 16 y HeLa al VPH 18. HeLa es tipo adenocarcinoma (células glandulares), CaSki es carcinoma epidermoide (exocérvix) y SiHa carcinoma escamoso grado II (células escamosas). Esto se debe a la localización del tipo de célula del cérvix (Figura 2).

El compuesto SL-78 fue el más activo de los once compuestos evaluados, su CI_{50} fue de $1.1 \mu\text{M}$, debido a este resultado se decidió determinar el efecto apoptótico, ROS y ciclo celular en las tres líneas celulares.

El tipo de muerte celular que se observó morfológicamente fue con características apoptóticas tanto en HeLa y CaSki, observándose además daño en la membrana celular y formación de cuerpos apoptóticos (Figura 21). El resultado se correlacionó con la evaluación de la apoptosis por citometría de flujo, utilizando Anexina V y 7-ADD, obteniendo mayor apoptosis en las células HeLa y CaSki. En los DotPlots de las figuras 22 y 24 se puede observar que las células HeLa y CaSki tratadas con el compuesto presentan mayor apoptosis, en particular en la apoptosis tardía donde

se concentra la mayor cantidad de células; esto nos indica que la membrana de la célula puede estar dañada. Por otro lado, en las células SiHa no se observó diferencia significativa comparada contra su control, posiblemente este resultado esté demostrando que el tipo de muerte sea diferente.

En el estudio de ROS, las células HeLa fueron las únicas que presentaron un ligero incremento de ROS, sin embargo, el valor no fue estadísticamente significativo, con este resultado se sugiere que en estas células se genera una pequeña cantidad de peróxidos en la membrana que ya se encuentra dañada, por esta razón se logra detectar esa fluorescencia. Las células SiHa y CaSki no presentaron un incremento de ROS, lo que nos indica que posiblemente la muerte de estas células no está asociado con especies reactivas de oxígeno, y que otros mecanismos puedan estar participando.

El ensayo de ciclo celular en el cual se cuantifica la cantidad de ADN con respecto al número de células, no se logró observar un arresto celular en alguna fase del ciclo en ninguna línea celular. Lo que nos indicaría que la mayoría de las células se encuentran apoptóticas, como se muestran en los DotPlots de apoptosis. Esto se pudiera atribuir al tiempo de exposición de 72 horas, en el cual no se logró ver el efecto del arresto celular y posiblemente a tiempos más cortos podríamos observar un arresto en alguna de las fases.

La síntesis y evaluación de nuevos compuestos forman parte de la fase preclínica que se realiza para el hallazgo de una nueva molécula con propiedades específicas para tratar alguna patología. El descubrimiento de una molécula y el desarrollo de

esta como fármaco, es un proceso largo, que conlleva a varias pruebas y ensayos en un periodo de aproximadamente 15 años hasta su comercialización.

El estudio que se realizó en el presente trabajo es una pequeña parte de la etapa preclínica, ya que los resultados que se obtuvieron fueron hechos mediante ensayos *in vitro* en tres líneas celulares de CaCu. De acuerdo a los Institutos Nacionales de Salud se sugiere que los compuestos nuevos sintetizados se prueben en 3 líneas resistentes y alrededor de 60 diferentes líneas celulares, debido a que una línea celular resulte más sensible que en otra.⁴¹ Pero para fines de estudio inicial, de manera rápida y de forma comparativa con Cisplatino que es altamente citotóxico en células HeLa, se decidió realizar el estudio enfocándonos principalmente en cáncer de cérvix.

El compuesto SL-78 mostró una actividad citotóxica sobre las células de cáncer cérvico-uterino, induciendo apoptosis con concentraciones de 1 μM , desde las 48 horas de exposición, este compuesto resultó ser más activo que el Cisplatino, el cual es el fármaco de primera línea para tratar el cáncer de cérvix utilizado en la clínica.

IX. CONCLUSIONES

- 1) Los compuestos ditiocarbamatos híbridos derivados del sistema DBH mostraron actividad citotóxica en células HeLa. Obteniendo tres compuestos activos: SL-78, SL-81 y SL-83.
- 2) Los compuestos más activos (SL-78, SL-81 y SL-83) mostraron una actividad citotóxica significativa en células HeLa, SiHa y CaSki.
- 3) El compuesto con mayor actividad fue el SL-78 con una CI_{50} 1 μ M en comparación con Cisplatino cuya CI_{50} fue de 5 μ M.
- 4) El compuesto SL-78 mostró un incremento significativo en el efecto apoptótico en células HeLa pero no en SiHa y CaSki.
- 5) La producción de ROS y el arresto en el ciclo celular no se vio modificada después de la exposición del compuesto SL-78 en las líneas de CaCu evaluadas.

X. PERSPECTIVAS

- ❖ Evaluar la actividad citotóxica del compuesto SL-78 en otras líneas celulares de cáncer y células sanas.
- ❖ Determinar el mecanismo de acción a través de la inhibición de tubulina y correlacionar con los ensayos del Docking.
- ❖ Realizar ensayos preclínicos como la evaluación de la actividad en modelos experimentales in vivo; por ejemplo xenotransplantes.
- ❖ Determinar la toxicidad sistémica del compuesto SL-78.

XI. REFERENCIAS

1. Jurado R, López FA, Álvarez A, García LP. Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An in vitro and in vivo study. *Oncol Rep.* 2009;22: 1237-1245.
2. Virus del papiloma humano y el cáncer [Homepage on the internet]. EUA; Instituto Nacional del Cáncer; c2015 [actualizado 19 febrero 2015; consultado 27 septiembre 2016]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infeciosos/hoja-informativa-vph>
3. Segovia MM, Jurado R, Mir R, Medina LA, Prado GH, García LP. Antihormonal agents as a strategy to improve the effect of chemo-radiation in cervical cancer: in vitro and in vivo study. *BMC Cancer.* 2015;15: 21
4. García LP, Rodríguez DM, Pérez CE, Cerbón M, Mohar BA. Synergistic effects of ICI 182, 780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53: 530-540.
5. Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1: 753-768.
6. Filosa R, Peduto A, de Caprariis P, Saturnino C, Festa M, Petrella A, Pau A et al. Synthesis and antiproliferative properties of N3/8- disubstituted 3,8-diazabicyclo[3.2.1] octane analogues of 3,8-bis[2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)pyridine-4-yl]methyl-piperazine. *Eur J Med Chem.* 2007; 42: 293-306.
7. Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem.* 2002; 45: 2615-2623.
8. Hanahan D. ; Weinber A. *Cell*, 2000, 100: 57-70
9. What is cancer? [Home page on the internet]. UK. Cancer Research UK; c2017 [consultado 25 febrero 2017]. Disponible en: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>
10. Modificado de Hanahan, D. & R.A. Weinberg, 2011.
11. Folkman, J. *Annu. Rev. Med.*, 2006, 57: 1-18
12. Lodish H.; Berk A.; Matsudaria P.; Kaiser C.; Scott M.; Zipursky.; Darnell J. *Biología celular y molecular.* 5a ed. Editorial Médica Panamericana. México. 2005
13. Naturaleza del cáncer [Home page on the internet]. EUA; Instituto Nacional del Cáncer; c2015 [actualizado 19 febrero 2015; consultado 28 diciembre 2016]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>

14. Cáncer. Nota descriptiva N° 297. [Homepage on the internet]. México; Organización Mundial de la Salud (OMS); c2015 [consultado 28 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
15. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero) [Homepage on the internet]. México; Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI); c2016 [actualizado 2 febrero 2016; consultado 28 diciembre 2016]. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf
16. Cameron R. Oncología Práctica. Panamericana. Barcelona. 2005.
17. Granados M, Arrieta O, Cantú D. Oncología y Cirugía Bases y Principios. México: El Manual Moderno; 2013. 499-530.
18. Abnormal cervical cells and treatment. [Homepage on the internet]. Inglaterra; Jo's cervical cancer trust. [actualizado 20 octubre 2016; consultado 2 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/the-cervix>.
19. Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cervico Uterino. [Homepage on the internet]. México; Secretaría de Salud; c2015 [actualizado 08 septiembre 2015; consultado 2 enero 2017]. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.
20. Estimado de número de muertes por cáncer en mujeres [Homepage on the internet]. México; Globocan; c2012 [consultado 2 febrero 2017] Disponible en: <http://gco.iarc.fr/>
21. Papilomavirus humanos (PVH) y cancer cervicouterino Nota descriptiva N° 380. [Homepage on the internet]. México; Organización Mundial de la Salud (OMS); c2015 [consultado 28 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/es/>
22. Guías diagnósticas 2013, cáncer cervicouterino
23. Laboratorio 2 PB de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, de la FES Zaragoza, C-II, UNAM
24. Ziyaei HA, Daras A, Ramezani M, Shamiri EV, Hooshmanda SE, Hashemib MM. Synthesis of Dithiocarbamates by Markovnikov Addition Reaction in PEG and Their Application in Amidoalkylation of Naphthols and Indoles. Chem Soc. 2015; 26:1500-1508
25. Xueling H, Zemei G, Tingmin W, Wei G, Jingrong C, Tieming C. et al. Dithiocarbamic acid esters as anticancer agent. Part1: 4- substituted-piperazine-1-carbodithioic acid 3-cyano-3,3-diphenyl-propyl esters. Bioorg Med Chem Lett. 2006;16: 4214-4219.
26. Keerthana B, Swathi RJ, Sreekanth S, Saritha JT, Vijjultha M. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of new dithiocarbamates substituted

- benzimidazole and chalcones as possible chemotherapeutic agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22: 3274-3277.
27. Potoguese, P.; Mikhail, A. *J Org Chem*, 1966,31; 1059-1062.
 28. Gilchrist T. *Heterocyclic Chemistry*. 2th ed, Wilmington, Addison-Wesley Iberoamericana,1999.
 29. (a) Reamuzon, P.; Bouzard, D.; Guiol, C.; Jacquet, J.J *Med Chem.* 1992,35;2898-2909; (b) Remunzon, P.; Massoudi, M.; Bouzard, D.; Jacquet, J. *Heterocycles*, 1992, 34; 679-684.
 30. (a) Bouzard, D.; Di Cesare, P.; Essiz, M.; Jacquet, J.; Kiechel, J.; Remuzon, P. *J Med Chem.*, 1990, 33; 1344-1352; (b) McGuirk, P.; Jefson, M.; Mann, D.; Elliott, N.; Chang, P.; Cisek, E. *J Med Chem.*, 1992, 35; 611-620.
 31. Murineddu G, Asproni B, Pinna G, Curzu M.M, Dore A, Pau A, et al. Synthesis of Biologically Active Bridged Diazabicycloheptanes. *Curr Med Chem.* 2012;19: 5342-5363.
 32. Yi-Chao Z, Ying-Chao D, Jin-Lian M, Rui-Min X, Xiaolin Z, Wen-Lei L. et al. Triazole-Dithiocarbamate Based Selective Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1) Inactivators Inhibit Gastric Cancer Cell Growth, Invasion, and Migration. *J Med Chem.* 2013;56: 8543-8560.
 33. Curso teórico-práctico [Homepage on the internet]. México; Instituto de Química. Dr. Abraham Madariaga Mazón. [consultado 18 septiembre 2017]. Disponible en: <https://www.iquimica.unam.mx/introduccion-a-docking-molecular>
 34. Tubulina [Home page on the internet]. EUA; Instituto Nacional del Cáncer; c2015 [actualizado 19 febrero 2015; consultado 25 Mayo 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=597173>
 35. Quezada RMA. El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias. *Contactos* 65, 5–12 (2007)
 36. Philip Rubin. *Oncología Médica*. 8° ed. Madrid: Elsevier; 2003.
 37. Gallardo J, Rodríguez S. Problema Bioquímico. Instituto Nacional de Cardiología. Depto. Bioquímica; REB 26(2): 73-74, 2007.
 38. Cambell N, Reece J. *Biology*. 8° ed. Pearson. 2008.
 39. Corrales L, Muñoz M. Estrés oxidativo: Origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. Colombia: 2012
 40. Yarh Liou-G, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *PMC*. 2010: 44(5).
 41. Hernández G, Moreno A, Zaragoza F, Porras A. *Tratado de Medicina Farmacéutica*. España: Médica Panamericana. 2010.