



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer  
Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer  
Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza  
(UMIEZ)

**Actividad antiproliferativa y necrótica, de los  
ditiocarbamatos SL-29, SL-11 y SL-12 en cultivos  
de células tumorales así como en cultivos de  
células linfocíticas no tumorales.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

**Abigail Aguilar Gregorio**

Director de tesis: Dr. Luis Sánchez Sánchez



**Ciudad de México, Noviembre 2017.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO


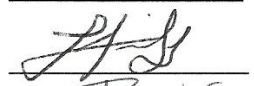
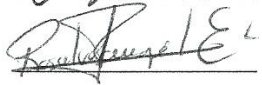

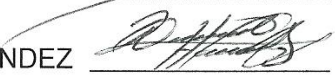
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **AGUILAR GREGORIO ABIGAIL**, con número de cuenta **307073387**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **21 de noviembre de 2017** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. BENNY WEISS STEIDER 
- VOCAL** M. en C. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ 
- SECRETARIO** M. en C. ROSALVA RANGEL CORONA 
- SUPLENTE** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ 
- SUPLENTE** M. en C. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ 

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa y necrótica, de los ditiocarbamatos SL-29, SL-11 y SL-12 en cultivos de células tumorales así como en cultivos de células linfocíticas no tumorales.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 24 de octubre de 2017

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

*“Amo el canto del cenizote, pájaro de cuatrocientas voces amo el color del jade, y el enervante perfume de las flores; Pero amo más a mi hermano el hombre”*

-Nazahualcoyotl

Todo tiene su tiempo, y todo lo que se quiere debajo del cielo tiene su hora...

*“Si no conozco una cosa, la investigaré”*

-Louis Pasteur

## **Dedicatoria**

*A Dios pues me ha dado la sabiduría para llegar hasta aquí, por fortalecer mi corazón en los momentos de prueba para seguir adelante y no desmayar y por poner en mi camino a aquellas personas que han sido mi ayuda y porque sin Cristo no sé qué dónde estaría hoy.*

*A mi mamá la mujer más hermosa, esforzada y valiente del mundo, por apoyarme y creer en mí siempre, por su amor genuino y templanza y por enseñarme que la vida y el tiempo no se desaprovechan sino que se disfrutan, eres mi inspiración, te amo.*

*A mis hermanitos Paula, Beatriz, Ramiro, Diana y Laura por su amor de hermanos, su ayuda en momentos de mucho trabajo y paciencia en esas noches de desvelo. Pau, hermanita me has acompañado desde el precolar en este magnífico andar hacia el conocimiento, sigues tu “Petu”.*

*A Ivanna “cosita bella” por inspirarme a ser mejor.*

*A Rocío por su inmenso amor, consejos y por alentarme a prepararme y ser la mejor, siempre haciéndolo bien y de buenas.*

*A Ángel por su apoyo y gran amor consentidor no solo para mí sino también para mis hermanos.*

*A Clever por todo el cariño y ayuda durante estos años, por motivarme a proseguir y no rendirme, por compartir conmigo largas horas de estudio, por su compañía en momentos buenos y malos, por ser un gran hombre y estar siempre pendiente de mí.*

*A mis amigos presentes y ausentes por ser como esos hermanos en tiempos de frustraciones, alegrías, prácticas, charlas y vivencias juntos, y porque a pesar de mi poca capacidad para expresar mi afecto no tienen duda de que los quiero.*

*Finalmente terminé familia, gracias por estar al pendiente preguntándome constantemente que cómo iba con mi tesis.*

## *Agradecimientos*

*A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México que me abrió sus puertas desde el año 2006, cumpliéndose así el inicio de uno de mis más grandes anhelos, ser universitaria puma.*

*A la ENP No. 5 “José Vasconcelos”, sitio donde despertó mi curiosidad por la ciencia y que marco sin duda alguna mi formación personal y académica.*

*A la FES Zaragoza y la carrera de Biología por proporcionarme el conocimiento a través de la guía de una larga lista de profesores, por facilitarme el espacio y los recursos necesarios para el pleno desarrollo de mi formación como bióloga.*

*A mi Director de Tesis, Dr. Luis Sánchez Sánchez mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mí, por su enorme paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección, por su pragmatismo con el que abordó cada una de las distintas etapas de la investigación, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias y por su apoyo y consejo para seguir este camino y llegar a la conclusión del mismo.*

*A todos los docentes que tuve a lo largo de la carrera, son un ejemplo de una combinación de saberes y disposiciones así como de un modo singular de transmisión del conocimientos, y a los presentes gracias por la inspiración, por todas sus aportaciones y asesorías, por sus conocimientos, paciencia, dedicación, así como también por el interés y motivación para la realización de esta tesis.*

# **Universidad Nacional Autónoma de México**

## **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (L-2 P.B.) perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México; bajo la dirección del Dr. Luis Sánchez Sánchez.

Así mismo este trabajo de tesis fue apoyado por los proyectos PAPIIT IN220916 y IN216718 así como de los proyectos CONACyT 255881 y 253979.

CDMX., a 21 de Noviembre 2017.





# ÍNDICE

RESUMEN .....	8
MARCO TEÓRICO .....	9
LA CÉLULA .....	9
CICLO CELULAR .....	9
MUERTE CELULAR .....	11
APOPTOSIS .....	12
NECROSIS .....	13
CÁNCER .....	14
CÁNCER CERVICOUTERINO .....	16
CÁNCER DE MAMA .....	17
CÁNCER DE PULMÓN .....	17
DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER .....	19
AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS .....	22
DITIOCARBAMATOS .....	22
DISULFIRAM .....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
JUSTIFICACIÓN .....	26
HIPÓTESIS .....	27
OBJETIVO GENERAL .....	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
MÉTODO .....	29
RESULTADOS .....	34
DISCUSIÓN .....	39
CONCLUSIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43

## Resumen

Las células se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular, en el cual la célula aumenta su tamaño, incrementa el número de componentes intracelulares (proteínas y orgánulos), duplica su material genético y finalmente se divide, dando paso a un proceso denominado proliferación, el cual está definido como el incremento del número de células como resultado del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte; la progresión a través del ciclo celular está regulada por puntos de transición (de control), que son clave ya que pueden detener el ciclo en puntos específicos, la alteración del ciclo celular puede causar que éste se detenga o que se active el mecanismo que induce a la célula a morir donde existen diversos mecanismos pero los más conocidos son la necrosis (muerte no programada) y la apoptosis (muerte programada), una falla en la regulación en el mecanismo de control del ciclo celular lleva a una proliferación celular excesiva y como consecuencia a la aparición del cáncer. Se han descrito más de 100 formas distintas de cáncer; los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres y que se generan en los epitelios; entre ellos, los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, mama, útero y cérvix. En México durante 2015, el cáncer fue la tercera causa de mortalidad debido a que es difícil descubrir nuevos agentes que eliminen selectivamente las células tumorales o inhiban su proliferación sin la toxicidad general. Los ditiocarbamatos muestran una amplia gama de actividades biológicas tales como antibacterianas, antifúngicas y contra el cáncer, un ejemplo es el Disulfiram el cual tiene una larga historia como elemento disuasivo del alcohol, sin embargo, tiene efectos anti-cancerígenos; también se ha descrito que los grupos funcionales bencilo o la piridina, le dan al compuesto una mayor potencia por ello a través de la elaboración de nuevas moléculas como el LS-29, LS-11 y LS-12 se espera que tengan un mejor efecto antiproliferativo y con baja citotoxicidad. Después de hacer las pruebas correspondientes para evaluar el efecto antiproliferativo y citotóxico en líneas celulares de cáncer de cérvix, mama y pulmón así como en cultivos de células no tumorales, los resultados obtenidos sugieren que el estado híbrido favorece la acción selectiva y permite que estos compuestos sean un modelo de partida para generar compuestos cuyos cambios estructurales sean dirigidos a sintetizar compuestos con mejor actividad antiproliferativa, de menor actividad necrótica y con una mejor acción selectiva.

## **Marco Teórico**

### **La célula**

Matthias Jacob Schleiden y Theodor Schwann propusieron el concepto de teoría celular (Pierce, 2010). De acuerdo con esta teoría, todas las criaturas vivas están formadas por células, y surgen sólo a partir de células preexistentes; siendo la unidad viva anatómica, funcional, de origen y de herencia más pequeña de los seres vivos (Gal *et al.*, 2007). Las células están constituidas por pequeños compartimentos separados del entorno externo, rodeados de membrana y llenos de una solución acuosa concentrada de compuestos químicos (Alberts *et al.*, 2008). En su interior se producen numerosas reacciones químicas que les permiten crecer, reproducirse por división, producir energía para sus actividades, ocuparse de actividades mecánicas, reaccionar a estímulos y eliminar residuos. El conjunto de estas acciones se llama metabolismo (Karp, 2011).

Todos los seres vivos tienen como misión fundamental la de reproducirse, preservando sus características esenciales a través de las generaciones (Ramírez y González, 2003). Para un organismo pluricelular, innumerables divisiones de un cigoto producen un organismo de complejidad y organización celular impresionantes (Karp, 2011). Las células se dividen a través de una serie ordenada de pasos denominados ciclo celular, en el cual la célula aumenta su tamaño, incrementa el número de componentes intracelulares (proteínas y orgánulos), duplica su material genético y finalmente se divide (Alberts *et al.*, 2008); dando paso a un proceso denominado proliferación, el cual está definido como el incremento del número de células como resultado del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte (Sánchez, 2001).

### **Ciclo celular**

La progresión de las células a través del ciclo de división celular se regula por señales extracelulares del medio, así como por señales internas que supervisan y coordinan los diversos procesos que tienen lugar durante las diferentes fases del ciclo celular (Cooper y Hausman, 2009), para así asegurar que la transición de una fase a otra, sólo se realice si los eventos de la etapa previa han concluido.

El sistema de control celular es un dispositivo bioquímico que actúa cíclicamente, compuesto por un conjunto de proteínas interactivas que inducen y coordinan los procesos subordinados básicos que duplican y dividen los contenidos de la célula (Alberts *et al.*, 2008); la progresión a

través del ciclo celular está regulada por puntos de transición, llamados puntos de control, que son clave ya que pueden detener el ciclo en puntos específicos. Los puntos de control aseguran que todos los componentes estén presentes y en el orden adecuado antes de que la célula proceda a la siguiente etapa (Campbell y Reece, 2007; Pierce, 2010) ya que facilitan la reparación del ADN y promueven la muerte celular en células sin reparar (Bucher y Britten, 2008). Las alteraciones en los puntos de control pueden conducir a una división celular desregulada, como es el caso de algunos tipos de cáncer (Pierce, 2010).

La alteración del ciclo celular puede causar que éste se detenga o que se active el mecanismo que induce a la célula a morir, por ejemplo, un daño irreparable en el ADN, induce a las células a una muerte por apoptosis. El descubrimiento de los puntos de control que gobiernan el ciclo celular nos ha llevado a comprender muchos de los fenómenos que se presentan en la vida celular tanto en la salud como en la enfermedad, siendo este último punto de particular interés para el estudio de posibles blancos terapéuticos donde se puedan combatir las anomalías del ciclo celular que desembocan en tumores, originados por una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos. Existen decenas de formas en que se presenta la enfermedad, pero su fisiopatología básica comprende aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular y que, por tanto, causan las desregulaciones de éste. Resulta poco menos que imposible, nombrar todos los tipos de alteraciones que existen en cada forma de tumor, sin embargo, se pueden mencionar algunos casos, por ejemplo: la Ciclina B se incrementa en casos positivos a los virus del papiloma humano (HPV, human papillomaviruses) 16 ó 18, los cuales son la principal causa de cáncer cervicouterino en mujeres. Además, estos PVH de alto riesgo codifican en su genoma oncoproteínas que también juegan un papel importante en la carcinogénesis, como es el caso de la oncoproteína E7, que al igual que el complejo ciclina D/CDK puede bloquear la función de Rb y así promover el ciclo celular, o la oncoproteína E6 que bloquea las funciones de p53 al unirse a este factor de transcripción; las células que sobre expresan c-myc, son resistentes a los efectos de arresto del crecimiento, promovidos por el TGF $\beta$  que induce la expresión de p15, p21 y p27 (los mismos CKIs reprimidos por c-myc), esta situación también se encuentra en aproximadamente 80 % de los tumores cervicales y por último cabe mencionar que el gen p53 se encuentra mutado en la mitad de los cánceres humanos conocidos (hígado, piel, pulmón, etc.) y la pérdida de la función de éste deja a las células sin un mecanismo para inhibir el

desarrollo de tumores y, por lo tanto, frente a un daño en el ADN que active un oncogén, las células no podrían detener su ciclo proliferativo y corregir el daño o morir por apoptosis. Cuando solo un alelo de p53 se encuentra mutado (proveniente del padre o la madre) su portador es susceptible a desarrollar algún tipo de cáncer (mama, osteosarcoma, etc.), esta condición se conoce como síndrome de Li-Fraumeni y el desarrollo del tumor dependerá del tejido en el que se produzca la segunda mutación que anule al alelo funcional ya que las mutaciones del gen p53 se reflejan en una proteína que no se degrada rápidamente y además inactiva a la proteína p53 silvestre al formar complejos multiméricos con ella (Quezada, 2007).

El ciclo celular es una red compleja controlada por un sistema de señalización. Este sistema de señalización celular determina las opciones que están disponibles cuando la célula sale del ciclo celular; pueden seguir cuatro vías posibles, dando lugar a destinos diferentes: senescencia, apoptosis, diferenciación y proliferación celular. El enlace íntimo entre el ciclo celular, la senescencia, la regulación de la apoptosis, el desarrollo del cáncer y las respuestas tumorales para el tratamiento del cáncer, se ha convertido en un tópico importante de investigación. Una amplia investigación sobre los genes supresores de tumores, oncogenes, el ciclo celular y los genes reguladores de la apoptosis ha puesto de manifiesto cómo las vías de señalización para detección de daños en el ADN están ligadas a la proliferación, la detención del ciclo celular, senescencia y apoptosis celular. El ciclo celular es un proceso altamente complejo que requiere de una alta precisión en los puntos de control, para evitar duplicaciones innecesarias del ADN, así como impedir que una célula que presente un daño en el ADN continúe duplicándose, ya que esto puede conducir a la formación de células tumorales (Lagunas *et al.*, 2014).

## **Muerte celular**

Aunque existen diferentes tipos de muerte celular, actualmente solo se han estudiado con mayor profundidad, la muerte apoptótica y la muerte necrótica. La necrosis se caracteriza por conducir a respuestas de tipo inflamatorio en las células, la alteración y desintegración rápida de la membrana plasmática, la fragmentación del ADN en fragmentos de diversos tamaños, etc., mientras que durante la apoptosis las células se someten a la contracción citoplasmática y nuclear, la cromatina se condensa y se fragmenta, y las células son finalmente divididas en varios cuerpos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos) (Zahran *et al.*, 2014).

## **Apoptosis**

Los organismos multicelulares han desarrollado un mecanismo de autodestrucción para eliminar a las células infectadas, dañadas y no deseadas, para que el conjunto pueda sobrevivir mejor. Esta muerte celular programada sigue patrones específicos tales como encogimiento de la célula, marginación de la cromatina, y fragmentación nuclear y fue denominada como apoptosis. Hemos sido testigos de un progreso explosivo en las últimas dos décadas en el campo, no sólo porque la apoptosis es un mecanismo evolutivamente conservado que gobierna la escultura corporal normal, la homeostasis, la defensa contra la invasión patógena y el estrés genotóxico, sino también porque la desregulación de la apoptosis conduce al cáncer y a la inmunidad (Wang y Youle, 2009).

La apoptosis elimina las células con ADN dañado, tejidos infectados, regula ciertas células del sistema inmunitario (los linfocitos B y linfocitos T) para evitar un autoataque, es parte integral del desarrollo de los tejidos, regula la cantidad de células que componen un órgano o tejido, mantiene la homeostasis mediante la actividad coordinada de los productos de genes que regulan la muerte celular. Existen proteínas complejas que involucran “sensores” que detectan el daño al ADN y transmiten las señales a las proteínas “transductoras” que, a su vez, transmiten las señales a numerosas proteínas “efectoras” implicadas en las vías celulares específicas, incluidos los mecanismos de reparación del ADN, los puntos de control del ciclo celular, la senescencia y la apoptosis. La familia de proteínas Bcl-2 se encuentra entre los más importantes reguladores de la apoptosis y lleva a cabo las funciones vitales para decidir si una célula vive o muere, incluso después de la quimioterapia y la radiación (Lagunas, 2014).

La apoptosis es un proceso activo en el que se consume ATP mediado primordialmente por caspasas (cisteinil-aspartato proteasas). Las caspasas se activan después de la permeabilización de la membrana mitocondrial, la activación de receptores con dominios de muerte capaces de reclutar procaspasas y la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático. En cuanto a los cambios morfológicos, la apoptosis se caracteriza por condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo y del ADN, dando origen a los cuerpos apoptóticos que contienen material celular degradado. La apoptosis es esencial para el desarrollo y homeostasis de los tejidos, participa en la respuesta inmune y en general en todos los procesos fisiológicos (Tabla 1) a diferencia de la necrosis; en la mayoría de los casos la apoptosis no desencadena una respuesta inflamatoria.

## Necrosis

En la necrosis hay ganancia de volumen celular (oncosis), ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular. Desde el punto de vista morfológico se le ha definido como el espectro de cambios post mortem en un tejido por la acción progresiva de enzimas propias de las estructuras lesionadas. El aspecto de las células necróticas resulta de la desnaturalización de proteínas y de la digestión enzimática autolítica o heterolítica. Por microscopia electrónica se observan soluciones de continuidad en las membranas plasmáticas y los organelos, así como marcada dilatación mitocondrial con apariencia de grandes densidades amorfas. Los análisis histológicos evidencian células eosinófilas por la unión más fuerte de la eosina con las proteínas citoplasmáticas desnaturalizadas y por la pérdida de la basofilia del citoplasma debida a los ácidos nucleicos. Los cambios nucleares se deben a la fragmentación inesperada del ADN, entre ellos se han descrito picnosis nuclear o pérdida de volumen, ligera condensación del ADN, aumento de la basofilia nuclear llamada cariorrexis y cariólisis cuando ya no se detecta estructura cromatínica (Ramírez y Rojas, 2010).

La acumulación celular puede resultar del aumento de la proliferación celular o el fallo en la apoptosis en respuesta a estímulos adecuados y ocurre en los llamados desórdenes proliferativos. Entre las enfermedades que se caracterizan por acumulación celular o aumento del número de células están las enfermedades autoinmunes, algunas infecciones virales y el cáncer (Sánchez, 2001).

Característica	Apoptosis	Necrosis
Estímulo	Fisiológico	Fisiológico y patológico
Efecto	Selectivo sobre la célula	Afecta al tejido circundante
Reversibilidad	Hasta la activación de las nucleasas	Irreversible, hay sensibilidad entre tejidos
Actividad de endonucleasas	Temprana	Post mortem
Morfología celular	Proyecciones digitiformes y cuerpos apoptóticos	Turgencia celular
Organelas	Turgencia tardía	Turgencia rápida
Núcleo	Cariorrexis	Diversos patrones
Cromatina	Condensación periférica	Condensación ligera, lisis
Fragmentación del ADN	Internucleosomal organizada	Aleatoria
Remoción y fagocitosis	Antes de la lisis	Tardía e incompleta
Inflamación	Ausente, excepto piroptosis	Heterólisis, Hsp
Autofagia	Inicia la apoptosis	Ausente
Cicatrización	Ausente	Fibrosis
ATP	Dependiente de ATP	Disminuido
Calcio	Permeabilidad mitocondrial	Favorece la necrosis
Caspasas	Dependiente	Independiente

**Tabla 1.** Diferencias básicas entre Apoptosis y Necrosis (figura tomada de Ramírez y Rojas, 2010).

## Cáncer

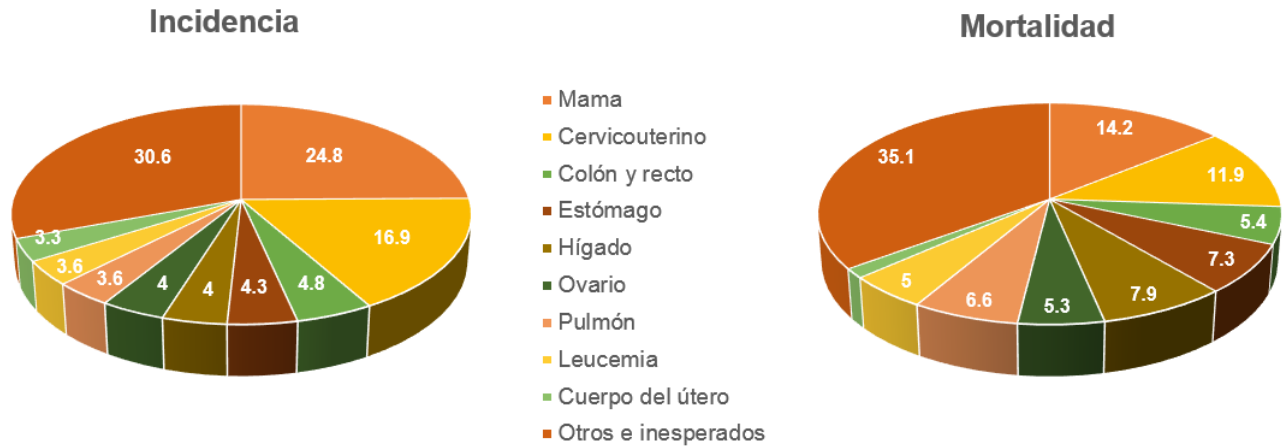
Una falla en la regulación en el mecanismo de control del ciclo celular lleva a una proliferación celular excesiva y como consecuencia a la aparición del cáncer. El cáncer resulta de múltiples alteraciones genéticas en los genes que controlan la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis. Existen dos grupos de genes que pueden ocasionar cáncer: 1) los oncogenes, que son genes mutados y cuya función normal es estimular la proliferación celular y 2) las proteínas supresoras de tumores, que restringen el crecimiento. La mayoría de las enfermedades malignas muestran defectos en al menos una de las proteínas reguladoras del ciclo celular (López, 2003).

Las células cancerosas difieren de las células normales en muchas e importantes características. Éstas incluyen la pérdida parcial de la diferenciación, la autosuficiencia en las señales de crecimiento, el potencial de replicación sin límites y la disminución de sensibilidad a los fármacos (Hanahan *et al.*, 2000). La progresión del cáncer es a menudo concebida y presentada como la transformación de una célula a través del tiempo a partir de un fenotipo benigno en una entidad invasiva. Las células neoplásicas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso llamado metástasis (National Cancer Institute, 2012). Las etapas de esta transformación están marcadas por una gran variedad de puntos de control genético e histopatológico, incluyendo la amplificación o la inactivación de genes específicos, la expresión de marcadores de tumores, alteraciones en el fenotipo de la célula y la arquitectura del tejido (Kumar *et al.*, 2009). La carcinogénesis es un proceso multifactorial en el que hay una interacción entre factores hereditarios, genéticos y ambientales que conducen al crecimiento celular descontrolado (Algranti *et al.*, 2010). El daño del ADN y las mutaciones posteriores son los eventos clave en la iniciación del proceso de la carcinogénesis, que en última instancia conduce a la enfermedad (Preston *et al.*, 2005).

Se han descrito más de 100 formas distintas de cáncer. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres y que se generan en los epitelios; entre ellos, los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, mama, útero y cérvix (Boticario, 2005). En mujeres de edad madura hasta la vejez una de las principales causas de muerte es el cáncer (Figura 1) y dentro de estos tumores malignos, se destacan el cáncer de mama y el cáncer cervicouterino, mientras que en hombres (Figura 2) el cáncer de próstata y pulmón (INEGI, 2011).

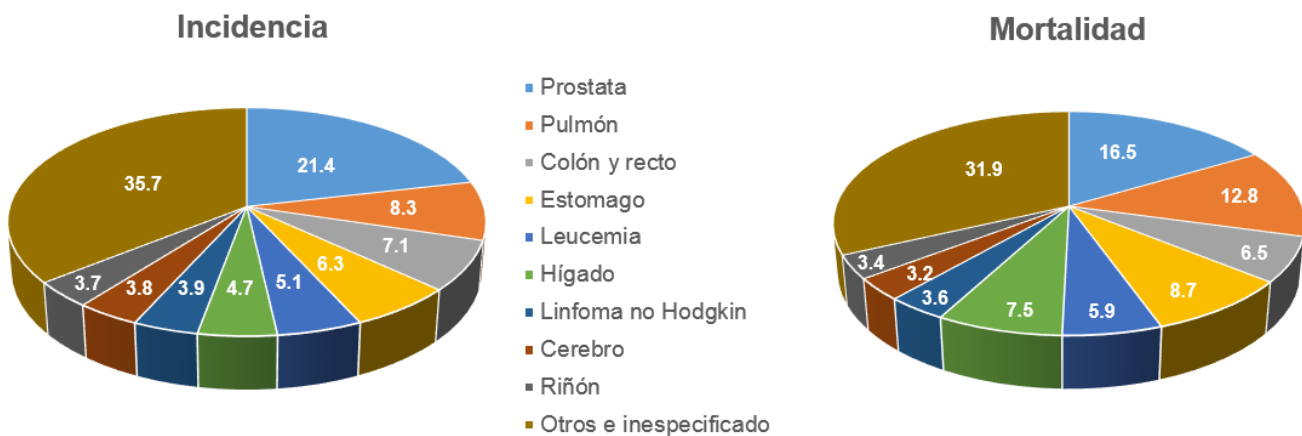


Las nuevas cifras publicadas en la primer semana de febrero de 2017 por la OMS señalan que cada año mueren de cáncer 8,8 millones de personas, en su mayoría en los países de ingresos



**Figura 1.** % de Incidencia y Mortalidad en mujeres mexicanas, tomada y modificada de <http://www.infocancer.org.mx/mujeres-con778i0.html>

bajos y medianos; causando hoy en día casi una sexta parte de la mortalidad mundial. Cada año se diagnostica algún cáncer a más de 14 millones de personas, cifra que, según se prevé, ascenderá a 21 millones para 2030. Los distintos tipos de cáncer, junto con la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades pulmonares crónicas, se denominan también enfermedades no transmisibles (ENT), que causaron 40 millones (70%) de los 56 millones de muertes que se registraron en 2015. Más del 40% de las personas que murieron de



**Figura 2.** % de Incidencia y Mortalidad en hombres mexicanos, tomada y modificada de <http://www.infocancer.org.mx/hombres-con779i0.html>

alguna ENT tenían menos de 70 años (OMS, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer, con 7.6 millones de casos, lo cual equivale al 13% de todas las muertes a nivel mundial, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios, principalmente por cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. En México durante 2009, murieron 65 de cada 100 mil personas a consecuencia de tumores malignos (INEGI, 2012).

En México durante 2015, 12 de cada 100 personas que murieron fue a consecuencia de tumores malignos, siendo la tercer causa de mortalidad (INEGI, 2015).

Se prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues se estima que pasará de 7.6 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (OMS, 2011).

### **Cáncer cervicouterino**

Cada año surgen en todo el mundo aproximadamente medio millón de casos nuevos de cáncer cervicouterino, enfermedad que puede llegar a ocasionar la muerte de mujeres a consecuencia de esta neoplasia. En México el cáncer cervicouterino (CaCU) es una de las principales causas de muerte en mujeres, generando una mayor tasa de mortalidad en los estados de Chiapas, Campeche, Veracruz, Quintana Roo, Tamaulipas, Morelos, Yucatán, Guerrero, Nayarit y Oaxaca (INEGI, 2011). México presenta un cúmulo de factores de riesgo para el CaCU, la prevalencia del Virus del Papiloma Humano (VPH) afecta hasta el 15% de las mujeres mayores de 35 años de edad (Alonso et al., 2005). Entre los factores de riesgo que se relacionan con el CaCU son: infección con virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo, el inicio temprano de la vida sexual, el uso de anticonceptivos hormonales, y el tabaquismo (Tirado, et al., 2005). En los últimos años se ha logrado una marcada declinación en la mortalidad gracias a la prueba de Papanicolaou (Serman, 2002). Los tratamientos que se utilizan actualmente como son la cirugía, radioterapia, quimioterapia y vacunas para tratar el cáncer cervicouterino, han tenido buenos resultados, sin embargo el efecto citotóxico generado en las quimio y radioterapias ocasionan efectos secundarios en la salud de las pacientes,

reduciendo la calidad de vida de éstas, ocasionado por el daño realizado a las células normales. Debido a esta razón, la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral, continúa (Tirado, et al., 2005).

### **Cáncer de mama**

En México, el cáncer de mama ocupa en la actualidad el primer lugar en incidencia de las neoplasias malignas en las mujeres, representa 11.34% de todos los casos de cáncer, hay un incremento global de aproximadamente 1.5% anual, sin embargo, en los países de economía emergente, este incremento es alrededor de 5%. El grupo de edad más afectado se encuentra entre los 40 y los 59 años de edad. La mortalidad por cáncer mamario se ha incrementado en 10.9% relativo en los últimos años, de 13.06 en 1990 a 14.49 en el año 2000.

El cáncer de mama en etapas iniciales se presenta de manera subclínica en la mayoría de los casos, es decir que solamente es detectable por estudios de imagen (mastografía, ultrasonido y resonancia magnética), en menor proporción por clínica (tumores palpables); sin embargo, otra forma de presentación común es como un tumor no doloroso que hasta en 30% se asocia a adenopatías axilares. Los tumores localmente avanzados en nuestro país representan 70% de las etapas clínicas al diagnóstico, pueden incluir cambios cutáneos como edema, ulceración, cutánides, así como afectación de ganglios como los supra e infraclaviculares homolaterales. El carcinoma inflamatorio de la mama, un tipo de presentación poco común pero de mal pronóstico y que por lo general progresa rápidamente, se caracteriza por una induración difusa de la mama con eritema, edema y aumento de la temperatura local en al menos un tercio de la glándula, en la mayoría de los casos no existe una tumoración franca palpable. Todavía menos frecuente es el diagnóstico de cáncer de mama por los síntomas de la metástasis y no por el tumor primario. Es de suma importancia tener en cuenta dentro del abordaje diagnóstico los factores de riesgo del paciente, sus condiciones generales y antecedentes heredo-familiares (Arce *et al.*, 2011).

### **Cáncer de pulmón**

En México, al igual que en los países desarrollados, el cáncer de pulmón es uno de los más frecuentes y la evolución y pronóstico de la enfermedad es más grave cuando se torna metastásico, es por eso, que la detección oportuna de esta entidad ha tomado tanta importancia.

El cáncer pulmonar es un tumor maligno que se desarrolla a partir de células, tanto pulmonares como bronquiales y fue considerado hasta mediados del siglo pasado como una enfermedad poco frecuente. A partir de 1930 su frecuencia ha aumentado y en la actualidad es el tumor maligno más frecuente en el mundo. Diversos autores denotan un incremento en la frecuencia del cáncer de pulmón en México en décadas recientes. Actualmente en nuestro país se encuentra entre las tres principales causas de muerte por tumores malignos en adultos mayores de 35 años y es más frecuente en varones, aunque se ha reportado un incremento mundial en los casos en mujeres (Moctezuma y Patiño, 2009). El cáncer de pulmón es una enfermedad mortal cuando se diagnostica en estadios clínicos avanzados. Lamentablemente, debido a los síntomas inespecíficos de esta enfermedad en sus estadios tempranos, para cuando los pacientes acuden a la consulta, generalmente el cáncer de pulmón se encuentra en estadio IIIB o IV, que implica una pobre sobrevida a cinco años; es por ello que las tendencias actuales y a futuro, respecto al cáncer de pulmón están dirigidas a realizar políticas de prevención en la población; a promover estilos de vida saludables; a fomentar el cese del consumo de tabaco, particularmente en jóvenes y adultos jóvenes; a difundir la práctica habitual de ejercicio y llevar una dieta saludable; a evitar el contacto con humo de segunda mano; a evitar exponerse a tóxicos ambientales, y a promover los cuidados y la protección ocupacional frente a cancerígenos. Por otro lado, los nuevos conocimientos moleculares y genéticos, el desarrollo tecnológico, las nuevas evidencias epidemiológicas, los nuevos modelos de diagnóstico y las nuevas armas terapéuticas han permitido un mejor control de la enfermedad, con perspectivas de encontrar una solución favorable en un plazo mediano (Amorin, 2013).

El cáncer representa la pérdida del control de la proliferación en un determinado tipo celular. Es un fenotipo múltiple en donde se presentan defectos en cientos, si no es que en miles de genes, que llevan a una enfermedad invasiva y letal, sin embargo, en la actualidad se está realizando investigación en la búsqueda de drogas anticancerígenas que puedan en determinado momento modular a las moléculas que controlan el ciclo celular (López, 2003).

## Diagnóstico y tratamiento del Cáncer

A pesar de grandes avances en muchas áreas de la medicina moderna en los últimos 100 años, el éxito de los tratamientos contra el cáncer sigue siendo un reto importante para el principio del siglo XXI (Xueling *et al.*, 2006).

El proceso de diagnóstico del cáncer implica un trabajo multidisciplinario, la historia clínica, el examen físico, los signos y síntomas actuales aportan importante información para el diagnóstico y para la planificación de los cuidados y del tratamiento. El proceso diagnóstico se inicia con la determinación de la causa de los síntomas, para esto se pueden utilizar múltiples procedimientos, adecuados a cada caso en particular; inicialmente se emplean los procedimientos menos invasivos, progresando en la complejidad de los mismos; después de establecer la presencia de un tumor, pueden realizarse más estudios para determinar el estadio, tales como estudios radiológicos, Resonancia Magnética Nuclear, ecografía, centellograma, tomografía de emisión de positrones, radioinmunoconjugados, endoscopia, estudios de laboratorio, marcadores tumorales, graduación, citología, biopsia y estadificación. Una vez hecho el diagnóstico, el tratamiento depende de la histología y de la extensión de la enfermedad. El tratamiento del cáncer se basa, según los casos, en el empleo aislado, simultáneo o sucesivo de la cirugía, la radioterapia (de manera local), y la quimioterapia, a las que en algunas ocasiones se añaden la inmunoterapia y la hormonoterapia (de manera sistémica).

- A. Cirugía. Constituye la modalidad terapéutica más frecuentemente utilizada, ya sea en forma aislada o, bien, en combinación con otros métodos. La cirugía oncológica desempeña un papel insustituible en el tratamiento del tumor primario y, en algunas localizaciones metastásicas, la adecuada terapéutica primaria con un definitivo tratamiento quirúrgico y el manejo de otras estrategias esenciales permiten el control del tumor y mejorar la calidad de vida del paciente. El período más crítico que atraviesa el paciente quirúrgico comprende desde la inducción anestésica hasta las primeras 48 horas. Durante este período se pueden producir complicaciones graves por fallo en el mantenimiento ventilatorio, aspiración del contenido gástrico, arritmias cardíacas, depresión miocárdica por fármacos e hipotensión progresiva debida a hemorragia, entre otras.
- B. Radioterapia. Consiste en la aplicación controlada de radiaciones ionizantes aplicadas de forma local, para lo que se utilizan diversos métodos y tecnologías; puede afectar los

tejidos sanos cercanos al área de tratamiento y, como consecuencia, pueden aparecer efectos secundarios tales como cansancio, reacciones en la piel, caída del pelo y mucositis; son difíciles de prever con exactitud, ya que dependen de múltiples factores, como son la zona del organismo donde se realiza el tratamiento, la dosis, el fraccionamiento y la susceptibilidad individual de cada persona.

- C. Quimioterapia. Consiste en la administración de medicamentos antineoplásicos para tratar el cáncer. Los efectos secundarios incluyen náuseas, vómito, estomatitis, mucositis rectal y/o vaginal, alteración del gusto, estreñimiento, alopecia y cambios de la piel. Algunos de los fármacos mayormente utilizados son el Cisplatino de acción farmacológica alquilante cuyo efecto se deriva de la inhibición de la síntesis de ADN y activa la apoptosis teniendo como efecto adverso la toxicidad renal, auditiva y hematológica; Paclitaxel (Taxol) de acción farmacológica antimicro-túbulo bloquea la mitosis e inhibe la proliferación celular y contribuye a la apoptosis, sus signos y síntomas son hipertensión o hipotensión, aumento de la temperatura y el pulso, desasosiego, broncoespasmos, enrojecimiento facial y urticaria.
- D. Bioterapia o inmunoterapia. Puede ser eficaz sola o en combinación con cirugía, quimioterapia y radioterapia. El tratamiento biológico, o tratamiento modificador de la respuesta biológica, consiste en agentes que modifican la relación entre el huésped y el tumor, al alterar la respuesta biológica del huésped a las células tumorales. Los fármacos biológicos afectan la respuesta huésped-tumor de tres maneras: 1) Tienen efectos antitumorales directos, 2) Restauran, aumentan o modulan los mecanismos del sistema inmunitario del huésped. 3) Tienen otros efectos biológicos como la interferencia, con la capacidad de las células cancerosas para metastatizar o diferenciarse.
- E. Hormonoterapia. La terapia hormonal como tratamiento para el cáncer puede significar tomar medicamentos que interfieren con la actividad de la hormona o detienen la producción de éstas. Las hormonas son sustancias químicas producidas por glándulas, como los ovarios y los testículos y ayudan a algunos tipos de células cancerosas para crecer, como el cáncer de mama y el de próstata y en otros casos, las hormonas pueden matar las células cancerosas, enlentecer o detener su crecimiento. Los efectos secundarios pueden variar dependiendo del tipo de terapia hormonal y pueden ser graves, moderados o ausentes (Aibar et al., 2011).

Para el 2016 según la American Cancer Society los medicamentos más comunes usados para la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante de cáncer de mama incluyen:

- Antraciclinas, como la doxorubicina (Adriamycin) y l epirubicina (Ellence)
- Taxanos, como el paclitaxel (taxol) y el docetaxel (Taxotere)
- 5-fluorouracilo (5-FU)
- Ciclofosfamina (Cytosan)
- Carboplatino (Paraplatin)

Los medicamentos que se utilizan con más frecuencia para tratar el cáncer cervicouterino avanzado incluyen:

- Cisplatino
- Carboplatino
- Paclitaxel (Taxol)
- Topotecán
- Gemcitabina (Gemzar)

Para el cáncer de pulmón microcítico en etapa avanzada la combinación de quimioterapia más común es etopósido más cisplatino o carboplatino.

Debido a que es difícil descubrir nuevos agentes que eliminen selectivamente las células tumorales o inhiban su proliferación sin la toxicidad general, el uso de la quimioterapia contra el cáncer tradicional, es todavía muy limitada (Xueling *et al.*, 2006). El ADN es uno de los blancos farmacológicos más esenciales de muchos fármacos en uso clínico; moléculas pequeñas que se unen al ADN han demostrado ser efectivos agentes terapéuticos antivirales, antibacterianos y anticancerígenos. Muchas, pequeñas moléculas interactúan con el ADN a través de (i) la intercalación; (ii) unión a la superficie; (iii) unión al surco menor, y (iv) unión al surco mayor. Una clase importante de fármacos en terapia contra el cáncer son intercaladores de ADN y el estudio de la interacción de tales agentes con el ADN, en particular su base estructural, podría ofrecer nuevas ideas sobre el diseño de nuevos fármacos contra el cáncer. La mayoría de las veces se requiere de la combinación de las terapias para obtener éxito, y éstas son eficientes en estadios tempranos de la enfermedad. Sin embargo, se generan efectos secundarios en el paciente, como pérdida de cabello, irritabilidad, vómito, mareo, etc.; estos

tratamientos son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas sin dañar en forma simultánea a las células normales. Por ello, ante esta situación, se buscan nuevos tratamientos y medidas de prevención que permitan una mejor calidad de vida del paciente. Entre las nuevas alternativas para contrarrestar el cáncer se buscan compuestos que tengan potencial antiproliferativo con acción selectiva.

Actualmente se han encontrado compuestos conocidos o aplicados en ciertas patologías no tumorales, presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en pruebas in vitro. Un ejemplo de estos compuestos son los Ditiocarbamatos, particularmente el Disulfiram (DSF), droga que ha sido utilizada por décadas en el tratamiento del abuso del alcohol, inhibiendo la enzima aldehído deshidrogenasa y recientemente propuesto como un agente anticancerígeno al igual que sus metabolitos (Chen *et al.*, 2006).

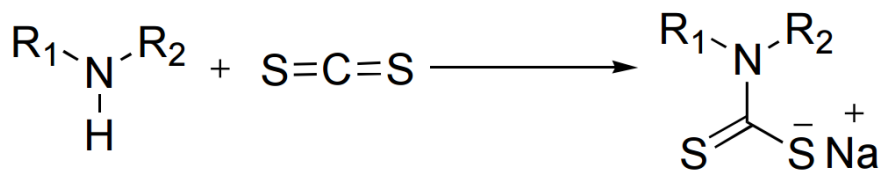
## Agentes antiproliferativos

Se han descrito fármacos conocidos que aparte de ser aplicados para una patología específica, presentan actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis en diferentes líneas celulares de cáncer; un ejemplo es el ácido acetilsalicílico, que además de ser un antiinflamatorio, tiene actividad de prevención para el cáncer de colon (Markowitz, 2007), o el diclofenaco, una droga antiinflamatoria que se le ha encontrado actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer de colon (Smirnova *et al.*, 2012). Actualmente ha surgido un fuerte interés en el Disulfiram, (droga que pertenece a los ditiocarbamatos, el cual se utiliza para el tratamiento del alcoholismo), debido a su descripción como compuesto con actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer (Cen *et al.*, 2002).

## Ditiocarbamatos

Los ditiocarbamatos son una clase común de moléculas orgánicas que muestran una amplia gama de actividades

biológicas tales como antibacterianas, antifúngicas y contra el cáncer (Kamal *et al.*, 2015). Los ditiocarbamatos exhiben una gran variedad de



**Figura 3.** Síntesis general de ditiocarbamatos tomada de Bala *et al.*, 2014.



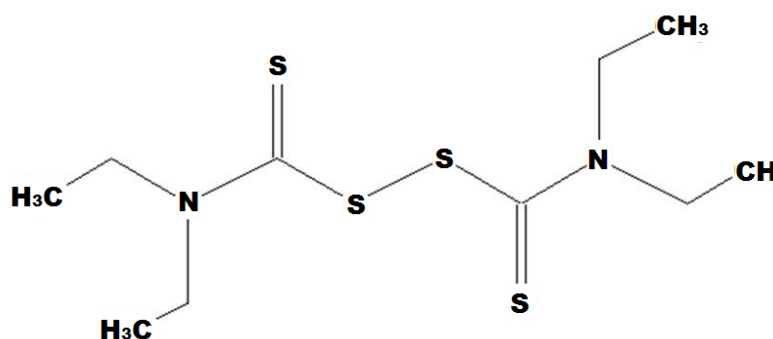
valiosos efectos biológicos, incluyendo actividad antibacteriana, actividad antifúngica, capacidad de quelar metales pesados; potentes inductores enzimáticos de fase II que podrían ser utilizados como agente quimiopreventivo de cáncer. El ácido ditiocarbámico representa un nuevo tipo de compuesto con una estructura novedosa, actividad anticancerígena significativa y muy baja toxicidad. (Xueling *et al.*, 2006).

Además de los ditiocarbamatos libres de metal, una serie de metales complejos de ditiocarbamatos que poseen actividades contra el cáncer, incluyendo la de zinc, hierro, rutenio, cobre y, en particular, de oro, han sido identificados en los últimos veinte años (Wai-Yin Sun *et al.*, 2016).

### Disulfiram (DSF)

Miembro de la familia de los ditiocarbamatos, los cuales son una clase de metalquelante, con varias aplicaciones como, el tratamiento de infecciones por bacterias u hongos, además de actuar como antioxidante (Khan *et al.*, 2007).

El disulfiram (DSF) es un miembro de la familia de los ditiocarbamatos (fig. 4) que comprende una amplia clase de moléculas que poseen un grupo funcional R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>NC(S)SR<sub>3</sub>, que les da la capacidad de metales complejos y reaccionan con grupos sulfhidrilo. El DSF es un inhibidor irreversible de la aldehído deshidrogenasa y es uno de los dos

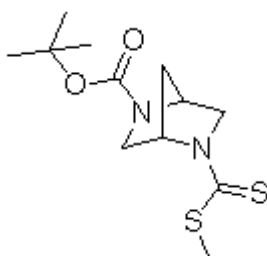


**Figura 4.** Estructura de Disulfiram (DSF).

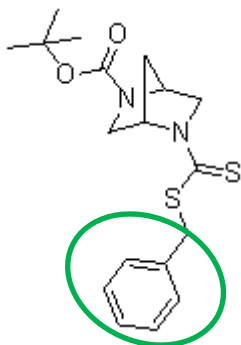
fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento del alcoholismo. Los ensayos clínicos han demostrado la eficacia del DSF sin presentar toxicidad. Varios estudios han demostrado que el DSF y sus metabolitos pueden potenciar el efecto de algunos fármacos contra el cáncer, sin embargo, los mecanismos precisos aún son desconocidos.

El DSF es capaz de unirse al cobre y formar un nuevo complejo, con actividad inhibidora del proteosoma, además de inducir apoptosis en células de cáncer de mama. El DSF aplicado en ratones portadores de xenoinjertos con MDA-MB-231, línea celular de cáncer de mama humano, inhibe potentemente el crecimiento tumoral, asociado con la inhibición *in vivo*

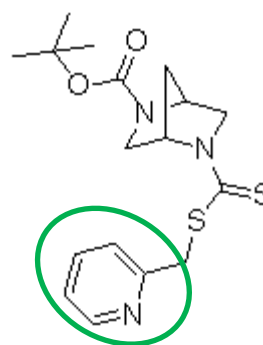
del proteasoma y la muerte celular apoptótica (Chen *et al.*, 2006). Estos resultados han generado en muchos grupos de investigación, la síntesis de nuevos ditiocarbamatos, con el propósito de encontrar nuevos compuestos con actividad antiproliferativa e inductores de apoptosis, para ser evaluados como agentes anticancerígenos con potencial terapéutico. Al respecto, el grupo de trabajo del Dr. Ignacio Regla y el Dr. Sujay Laskar, del laboratorio de síntesis de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, sintetizaron los ditiocarbamatos SL-29, SL-11 y SL-12; el SL-29 presenta la estructura general Tert-butyl (1S,4S)-5-((methylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (fig. 5) y a partir de éste, se obtienen los compuestos SL-11 y SL-12, adicionando un grupo carbonotioil bencilio para el LS-11 (fig. 6) y un carbonotioil piridina-2-ilmetil tio para el LS-12 (fig. 7), de los cuales se desconoce su actividad antiproliferativa y necrótica. En este sentido, este trabajo tiene el propósito de evaluar la actividad antiproliferativa y necrótica de estos compuestos en células tumorales.



**Figura 5.** Tert-butyl (1S,4S)-5-((methylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**SL-29**).



**Figura 6.** Tert-butyl (1S,4S)-5-((benzylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-11**).



**Figura 7.** Tert-butyl (1S,4S)-5-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-12**).

## Planteamiento del problema

Los tratamientos contra el cáncer como la quimioterapia y la radioterapia, son ineficientes en etapas avanzadas de esta enfermedad, altamente agresivas y muestran poca selectividad, además de ser fuertemente citotóxicos (necróticos), generando la necesidad de buscar nuevas estrategias basadas en compuestos que presenten actividad antiproliferativa de baja o nula citotoxicidad y con acción selectiva.

Muchas de las terapias actuales contra el cáncer están limitadas por la gravedad y frecuencia de los efectos secundarios adversos y existe una alta demanda de alternativas no tóxicas. Una fuente de nuevas terapias puede ser a través de la utilización de fármacos aprobados clínicamente, en los que la seguridad y sus efectos colaterales ya han sido demostrados. Un ejemplo claro es el ditiocarbamato Disulfiram el cual tiene una larga historia como elemento disuasivo del alcohol, sin embargo, tiene efectos anti-cancerígenos demostrados en una gama de hematomas malignos. La actividad biológica del disulfiram se atribuye a su capacidad para unir cationes divalentes y perturbar los procesos dependientes de los metales (Wiggins *et al.*, 2014). Por ello, en este trabajo, la actividad antiproliferativa y citotóxica de los ditiocarbamatos SL-29, SL-11 y SL-12 fueron evaluados *in vitro*.

## Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues se estima que pasará de 7.6 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, se estima que durante el mismo periodo el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones.

A nivel mundial en 2015, los tumores malignos de próstata, pulmón, colorrectal, estómago e hígado son los más comunes entre los varones, mientras que en las mujeres son los de mama, cérvix, colorrectal, estómago y pulmón (INEGI, 2016).

## Hipótesis

Se ha descrito que numerosos compuestos de la familia de los ditiocarbamatos presentan actividad antiproliferativa, citotóxica y apoptótica en líneas celulares tumorales, donde la presencia de la molécula (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane (DBH) en los compuestos, incrementa la actividad biológica. También se ha descrito que los grupos funcionales bencilo o la piridina, le dan al compuesto una mayor potencia. Al respecto, los compuestos Tert-butyl (1S,4S)-5-((benzylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-11**), el Tert-butyl (1S,4S)-5-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-12**) y el Tert-butyl (1S,4S)-5-((methylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**SL-29**), presentan la molécula DBH, además, el LS-11 y 12 presentan un grupo tiobencilo y una metil-piridina respectivamente, generando la posibilidad de que estos compuestos presenten una mayor actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales.

## Objetivo General:

Evaluar la actividad antiproliferativa y necrótica, de los ditiocarbamatos tert-butyl (1S,4S)-5-((methylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**SL-29**), tert-butyl (1S,4S)-5-((benzylthio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-11**) y tert-butyl (1S,4S)-5-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-12**) en las líneas tumorales CaSki (cáncer cervicouterino), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y SK-Lu-1 (cáncer de pulmón) así como en cultivos de células linfocíticas no tumorales.

## Objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad antiproliferativa, de los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y SK-Lu-1, expresada como la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50 % el número celular ( $CI_{50}$ ).
2. Determinar la actividad necrótica, de los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 en las líneas celulares CaSki, MDA-MB-231 y SK-Lu-1, mediante la detección de la actividad de la enzima citoplasmática LDH en los sobrenadantes celulares.
3. Establecer si la actividad antiproliferativa presente en los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 ( $IC_{50}$ ), afecta el potencial proliferativo de células linfocíticas, mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína, cuantificada por citometría de flujo.
4. Valorar si los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 a las concentraciones de  $IC_{50}$ , inducen muerte necrótica en células linfocíticas, mediante la técnica de actividad enzimática de LDH en los sobrenadantes celulares.

## **Método**

### **Cultivo de células tumorales de cáncer cervicouterino, mama y pulmón.**

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones estériles. La línea celular CaSki proveniente de CaCu fue sembrada en cajas petri de cristal de 100 mm de diámetro (Pirex USA) con 10 ml de medio de cultivo RPMI-1640 (1640 del Roswell Park Memorial Institute; GIBCO, USA), suplementado con L-glutamina, bencilpenicilina (Grüunenthal, MEX) y NCS (suero de neonato de ternera; GIBCO, USA) al 5%, previamente desactivado a 56°C durante 30 minutos. La línea celular MDA-MB-231 proveniente de cáncer de mama y la línea celular SK-LU-1 proveniente de cáncer de pulmón fueron sembradas del mismo modo antes mencionado.

Los cultivos se mantuvieron incubados a una temperatura de 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, a una atmósfera húmeda a punto de rocío en incubadora (Nuair, USA) durante 24 h. Para realizar las pruebas biológicas, las células fueron tomadas de cultivos a una densidad del 70% en fase de proliferación.

### **Cultivo de células no tumorales (linfocitos)**

En tubos Vacutainer con EDTA (BD, USA), fueron obtenidos 20 ml de sangre periférica de un voluntario sano. Se colocaron 5 ml de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, USA) y 5 ml de sangre en tubos cónicos de vidrio (Pirex, USA) dando un total de 4 tubos; se cubrieron con papel aluminio y fueron centrifugados (Centrifuga; Dinac, USA), a una velocidad inicial de 300 rpm aumentando 300 rpm cada 2 minutos hasta llegar a 1500 rpm, después de lo cual se dejaron centrifugando por 25 minutos adicionales. Con ayuda de la pipeta de 1000 µl se retiró el plasma y se colectó el anillo de leucocitos cuidadosamente; posteriormente, el paquete celular obtenido de cada tubo fue transferido a otro tubo limpio para ser resuspendido con 10 ml de PBS, realizándose lo anterior con los otros 3 tubos. Nuevamente las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para retirar el sobrenadante y fueron resuspendidas en 1 ml de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Hyclone, USA) anticipadamente desactivado, las células fueron concentradas a un solo tubo (volumen total de 4 ml). Se sembraron las células en una caja Petri de 100 mm (Pirex, USA), en un volumen total de 10 ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB, y se incubaron durante 1 hora. Transcurrido el

tiempo, se cosecharon todas las células que permanecieron en suspensión, en un tubo de vidrio de fondo cónico. Se centrifugó la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió nuevamente el botón celular en 5 ml de RPMI-1640 sin suero. Consecutivamente, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ l y se determinó el número celular con ayuda de la cámara de Neubauer.

## **Compuestos LS-29, LS-11 y LS-12**

Los compuestos (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-ditiocarbamatos SL-29, SL-11 y SL-12 fueron sintetizados por el Dr. Sujay Laskar, con la colaboración del Dr. Ignacio Regla Contreras, en el Laboratorio de Síntesis de Fármacos de la Unidad Multidisciplinaria de Estudios Superiores Zaragoza en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

El compuesto tert-butilo (1S,4S)-5-((metiltio)carbonotioil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato (SL-29) fue solubilizado en Etanol (EtOH) para llevar a cabo las pruebas biológicas y se preparó un stock con 1 mg de compuesto en 100  $\mu$ l de EtOH quedando un stock inicial a una concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l. Se repitió lo anterior con los compuestos tert-butilo (1S,4S)-5-((benziltio)carbonotioil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato (LS-11) y tert-butil (1S,4S)-5-(((piridina-2-ilmetil)tio)carbonotioil)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxilato (LS-12).

## **Determinación de la actividad antiproliferativa (CI<sub>50</sub>).**

Para establecer la Concentración Inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>) fueron sembradas 5,000 células/pozo en placas de 96 pozos (Corning, USA), usándose 100  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI-1640 al 5 % de NCS por pozo, durante 24 horas para cada línea celular (CaSki, MDA-MB-231 y SK-Lu-1), y se mantuvieron incubadas bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, simulando las condiciones del cuerpo humano. Posteriormente se retiró el RPMI-1640 de cada pozo, y luego se estimularon las células con SL-29 partiendo de una concentración de 0.78  $\mu$ g/mL hasta llegar a 100  $\mu$ g/mL (se tomó del stock inicial), y se utilizó como control negativo, células sin tratamiento y células tratadas con 10  $\mu$ l de vehículo, y al cabo de 24 horas las placas de cultivo fueron evaluadas por el método de incorporación de cristal violeta. Se elaboró una gráfica dosis-respuesta que generó los intervalos para calcular la CI<sub>50</sub>, y así se determinó la concentración adecuada de LS-29 para disminuir en un 50% la



proliferación celular en las diversas líneas tumorales de cáncer (cervico-uterino, mama y pulmón). Se repitió el procedimiento anterior para el SL-11 y SL-12 respectivamente.

### **Determinación de la proliferación celular mediante la técnica de incorporación del colorante cristal violeta.**

La técnica con la que se evaluó la proliferación celular consistió en sembrar y estimular a las células en las mismas condiciones del cultivo mencionadas anteriormente y transcurrido el tiempo de estímulo (24 horas), las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% (SIGMA-Aldric, USA) durante 15 minutos; posteriormente las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadió 50 µl/pozo de colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico (SIGMA-Aldric, USA) pH 6.0 y se mantuvo durante 20 minutos en agitación constante con ayuda del SHERMAN. Después de la tinción, las cajas de cultivo fueron lavadas con agua desionizada o bidestilada de tal manera que el colorante no asimilado fuera totalmente retirado de los pozos. Luego se añadió 50 µL/pozo de ácido acético al 10% y se dejaron en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente, con el propósito de desteñir las células y procurar que el colorante quedará en suspensión de forma homogénea. Por último, se tomó lectura de cada pozo en un lector de placas de ELISA (ELx800; Bio-Tek) a 590 nm, y las densidades ópticas se graficaron como porcentaje de proliferación celular con respecto al vehículo.

### **Determinación de necrosis a partir de la liberación de LDH**

En placas de 96 pozos (Corning, USA), se sembraron 5,000 células/pozo de las líneas celulares (CaSki, MDA-MB-231 y SK-Lu-1) con 100 µL de medio RPMI-1640 al 5% de NCS y se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se retiró el medio de cultivo y las células fueron estimuladas con los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 a sus respectivas CI<sub>50</sub> en medio de cultivo fresco; se consideró, un control positivo y un control basal o negativo a los cuales sólo les fue cambiado el medio de cultivo por medio fresco y un control más que contempló la cantidad de etanol máxima utilizada para solubilizar cada compuesto (10ml/µL). Una hora antes de cumplir las 24 horas de estímulo, al control positivo se le cambió el medio por un medio fresco al 1% de tritón X-100, y así cumplidas las 24 horas se recuperó el medio de cultivo de cada uno de los pozos en tubos cónicos de plástico de 600 µl y se centrifugaron a

2,000 rpm durante 10 min. Por pozo fueron colocados 40  $\mu$ L de medio en una placa de 96 pozos y se agregaron 40  $\mu$ L/pozo de mezcla de reacción del Kit Non-radioactive Cytotoxicity assay (Bio-Vision, USA) y se dejó incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en la obscuridad. Pasado el tiempo la absorbancia fue determinada en un lector de placas de ELISA (SofMaxPro USA) a 490 nm. Finalmente se calculó el porcentaje de citotoxicidad con la siguiente fórmula:  
$$\% \text{ citotoxicidad} = [(muestra - \text{control negativo}) / (\text{control positivo} - \text{control negativo})] * 100.$$

### **Proliferación de linfocitos humanos con carboxifluoresceína (CFSE)**

Para el ensayo de carboxifluoresceína fueron utilizados los linfocitos obtenidos a través del proceso antes descrito; después de ser contados se llevaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml y se cuidó mantener esta concentración hasta el final del medio total. Para marcar con la carboxifluoresceína diacetato succinimidyl ester (CFSE; Sigma-Aldrich, USA), los linfocitos fueron resuspendidos en 4 ml de PBS con 10  $\mu$ l de CFSE (12  $\mu$ M por mililitro de solución/ millón de células) y se incubaron durante 15 minutos protegidos de la luz a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS al 5 % de SFB, luego se centrifugaron a 1500 rpm y se resuspendieron en 4 ml de RPMI-1640 al 20 % de SFB. Posteriormente, los linfocitos fueron transferidos a tubos eppendorf de 1.5 ml a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml de RPMI-1640 suplementado con 20% de SFB y 25  $\mu$ l/ml de fitohemaglutinina (FHG; Micro Lab S.A., Mex.) diluida 1:10 en PBS homogenizando la suspensión.

A continuación, los linfocitos fueron transferidos a tubos cónicos de 1.5 ml con el tratamiento a evaluar y se cuidó de mantener una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml de medio total. Las condiciones establecidas fueron las siguientes: sin activar (sin FHG), activados (con FHG); vehículo, al cual se le agregó la cantidad de etanol empleado en la preparación de la concentración más alta del LS-29. Las células contenidas en cada tubo cónico fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pozos a una concentración de 200,000 células/pozo en un volumen de 200  $\mu$ l y fueron incubadas en condiciones de cultivo por 72 horas.

Para la evaluación de proliferación, las células fueron cosechadas y centrifugadas a 1500 rpm. El medio de cultivo fue colectado en tubos cónicos de plástico (eppendorf) de 1.5 ml y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar actividad de LDH. Las células fueron resuspendidas en 250  $\mu$ l de Verseno frío por 5 minutos, posteriormente se centrifugaron las muestras y se retiró el Verseno; finalmente se resuspendió con 500  $\mu$ l de PBS y 500  $\mu$ l de

paraformaldehído al 2 % y la fluorescencia en los cultivos celulares fue determinada en un citómetro de flujo FACSAria II. Los datos fueron procesados en el programa FACSDiva versión 6.1.2. (Quah y Parish, 2010 y 2012).

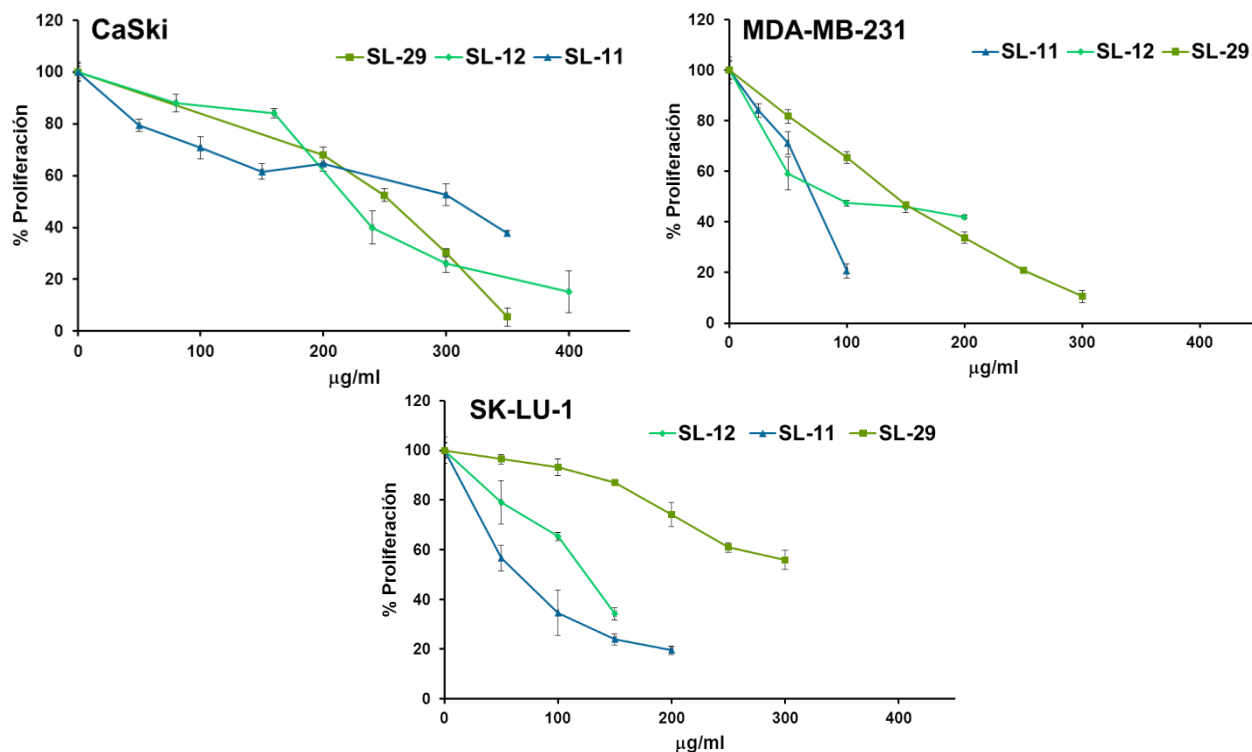
### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se mostraron como la media de 3 experimentos independientes, con al menos 6 repeticiones; se sometieron todos los resultados obtenidos a un análisis estadístico haciendo uso de Microsoft Excel 2010.

# Resultados

## Actividad antiproliferativa

Con el propósito de establecer si los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 presentan actividad antiproliferativa en células tumorales, células CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 fueron cultivadas y tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos por 24 horas, y el número celular fue evaluado mediante la técnica de cristal violeta y la actividad antiproliferativa fue expresada como la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50% el número celular ( $CI_{50}$ ) (Fig. 8).



**Figura 8.** Actividad antiproliferativa de los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, cáncer de mama MDA-MB-231, y cáncer de pulmón SK-LU-1. 5000 células fueron sembradas en placas de 96 pozos y estimuladas con diferentes concentraciones de los compuestos por 24 horas, posteriormente el número celular fue evaluado a través de la técnica de cristal violeta. Las gráficas son representativas de tres repeticiones por sextuplicado.

Los resultados mostrados en la figura 8, tabla 2, establecen que los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 afectan el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera

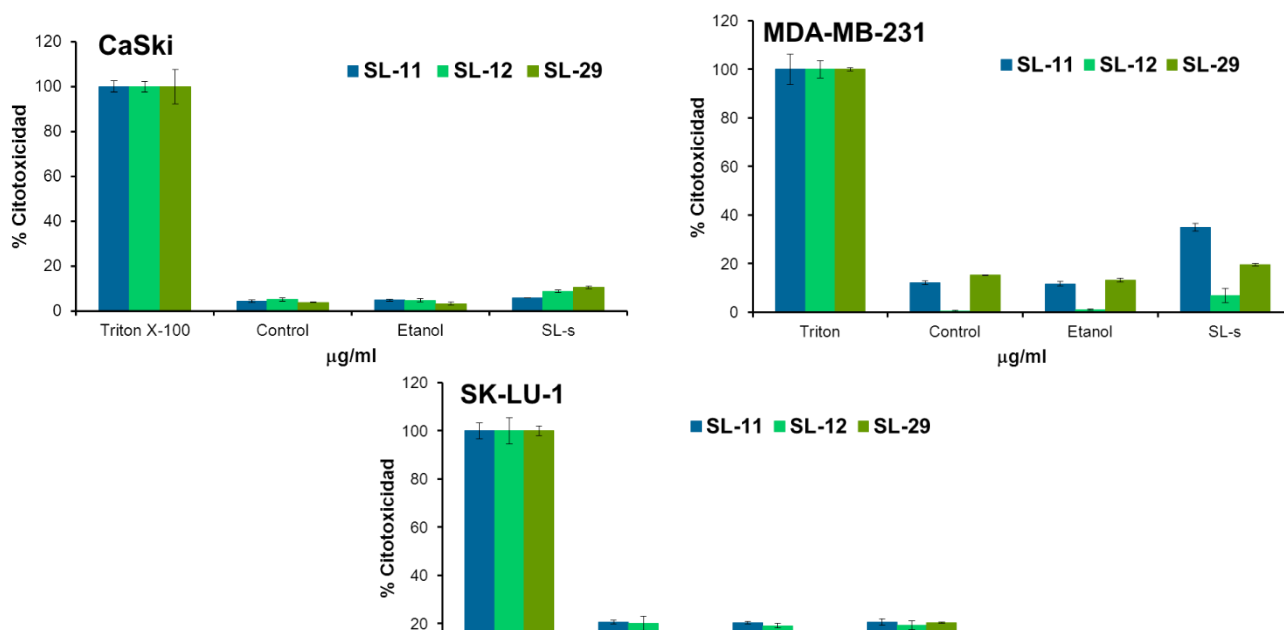
dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración, el número celular disminuye. Las  $CI_{50}$  calculadas para cada línea son mostradas en la tabla 2.

Compuesto	$CI_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ ( $\mu\text{M}$ )		
	CaSki	MDA-MB-231	SK-LU-1
SL-29	346 (1201.38)	150 (520.83)	300 (1041.66)
SL-11	294 (806.54)	69 (189.29)	57 (156.37)
SL-12	305 (835.34)	100 (273.88)	120 (328.65)

**Tabla 2.** Concentración requerida del compuesto que abate en un 50% el número celular ( $CI_{50}$ ), calculadas para las líneas celulares con los tres compuestos. Usando el EtOH como 100%.

## Actividad citotóxica

Con la intención de establecer si el decremento en el número celular, inducido por los compuestos, es debido a una actividad citotóxica, cultivos de las tres líneas tumorales fueron tratadas con sus respectivas  $CI_{50}$  por 24 h y la actividad necrótica de los compuestos fue evaluada determinando la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Fig. 9).



**Figura 9.** Actividad citotóxica de los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 en las líneas celulares de cáncer cervicouterino CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1. 5000 células fueron sembradas en placas de 96 pozos y estimuladas con las concentraciones de  $CI_{50}$  respectiva de cada línea con cada compuesto y el efecto citotóxico (necrótico) fue evaluado mediante la técnica de liberación de la enzima citoplasmática LDH. Las gráficas son representativas de por lo menos 3 experimentos con 3 repeticiones cada uno.

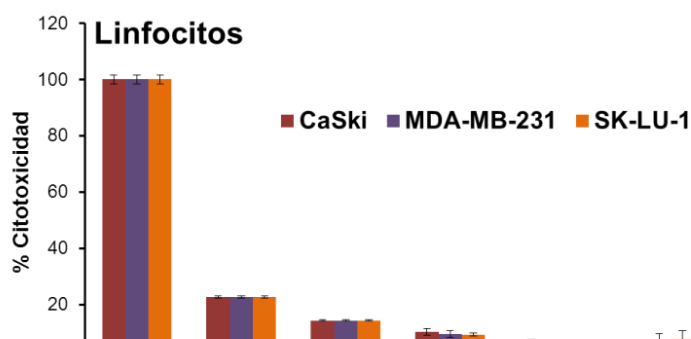
Los resultados mostrados en la figura 9, establecen que los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 no inducen la liberación de la LDH de manera significativa en las tres líneas tumorales, indicando que el decremento en el número celular inducido por los compuestos SL-11, SL-12 y SL-29 es debido a un proceso diferente a la muerte celular necrótica. El porcentaje de actividad de LDH determinada en los cultivos celulares es mostrada en la tabla 3.

Compuestos	LDH (% Citotoxicidad)		
	CaSki	MDA-MB-231	SK-LU-1
SL-29	7	4	5
SL-11	1	23	0
SL-12	4	6	0

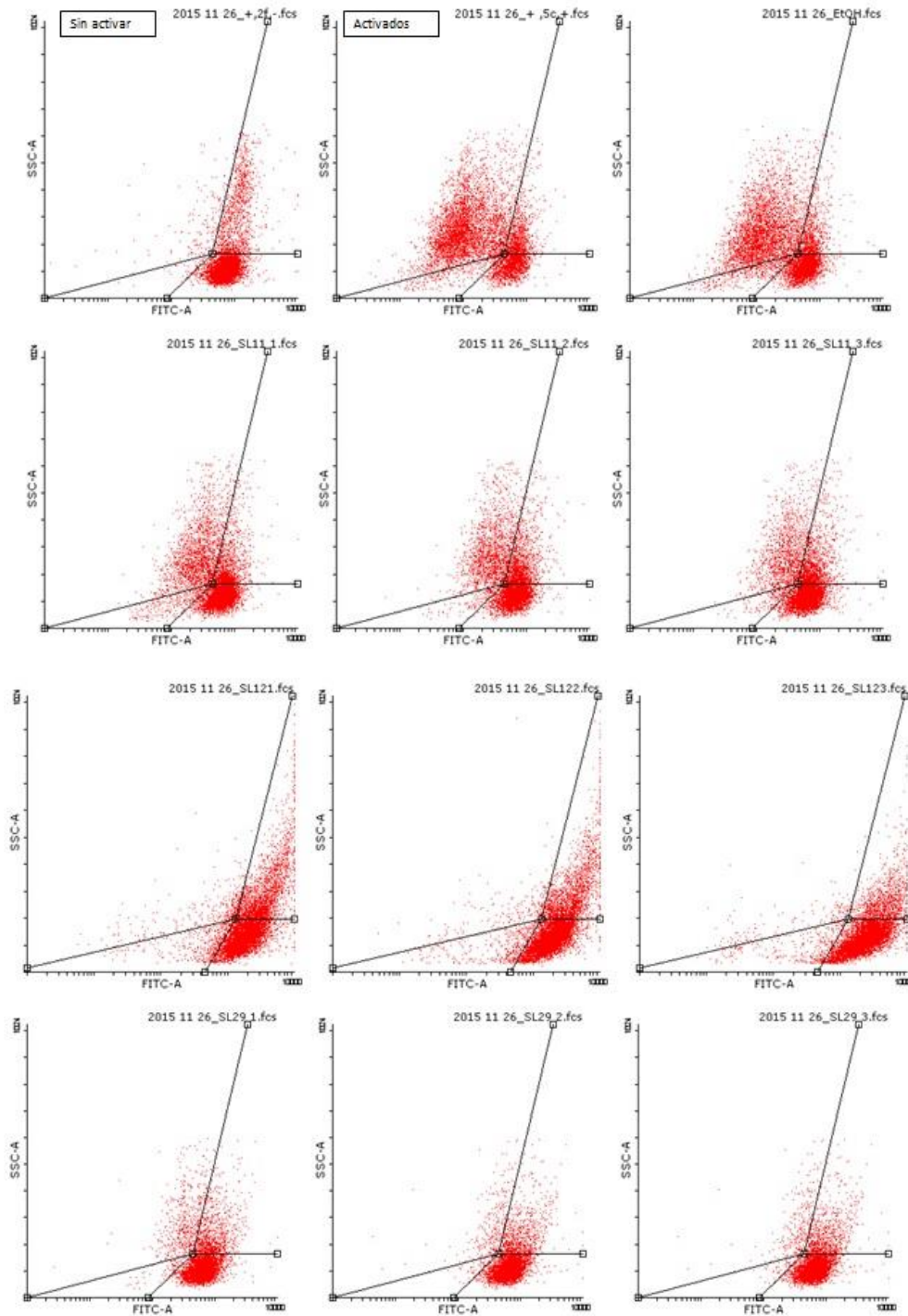
**Tabla 3.** Determinación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en sobrenadantes de cultivos de células tumorales con SL-29, SL-11 y SL-12. Usando el Tritón como 100%.

### Efecto antiproliferativo en células no tumorales

Los datos obtenidos muestran que los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 ejercen una actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de cérvix, mama y pulmón. Para determinar si los compuestos afectan el potencial proliferativo de células no tumorales, cultivos de células linfocíticas humanas no tumorales, fueron tratados con los compuestos a las concentraciones de  $CI_{50}$  determinadas para las células tumorales y la proliferación y liberación de la LDH fueron evaluados (Figura 10, 11 y tabla 4).



**Figura 10.** Actividad citotóxica de los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 en cultivos de linfocitos humanos. Cultivos de linfocitos humanos fueron sembrados en placa de 96 pozos y estimulados con cada compuesto según la  $CI_{50}$  para cada línea celular; el efecto citotóxico fue evaluado mediante el kit de detección de LDH y las gráficas son representativas de por lo menos 3 experimentos con 3 repeticiones cada uno.



**Figura 11.** Efecto del LS-11, LS-12 y LS-29 en el potencial proliferativo de cultivos de células linfocíticas humanas de sangre periférica. Los linfocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos y estimulados con la  $Cl_{50}$  de cada compuesto correspondiente a cada línea celular. Los linfocitos fueron evaluados a las 72 h de cultivo por citometría de flujo. Este ensayo es representativo de por lo menos 3 experimentos independientes con 3 repeticiones.

Compuestos	Proliferación de Linfocitos %					
	CASKI	%LDH	MDA	%LDH	SK	%LDH
<b>SL-11</b>	37	0	43	0	51	0
<b>SL-12</b>	10.68	0	4.1	0	3.23	0
<b>SL-29</b>	10	0	2	0	6	0

**Tabla 4.** Determinación del efecto de los compuestos SL-29, SL-11 y SL-12 en cultivos de células de linfocitos humanos de sangre periférica en su potencial proliferativo, así como determinación del efecto citotóxico.

Los resultados mostrados en la figura 11, establecen que los compuestos LS-29, LS-11 y LS-12 afectan el potencial proliferativo de células linfocíticas de manera significativa, sin embargo, no se detectó actividad de LDH en los cultivos tratados, indicando que los compuestos afectan el potencial proliferativo de las células linfocíticas sin inducirlos a una muerte necrótica, sugiriendo que la causa del decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica.



## Discusión

La búsqueda de compuestos con actividad antiproliferativa, inductora de apoptosis y de acción selectiva, es actualmente el objetivo de un gran número de investigadores. Pese a la extensa cantidad de compuestos descritos con actividad antitumoral, son pocos los trabajos que describen de manera adecuada si el compuesto presenta acción selectiva. En el diseño de fármacos y la ingeniería de productos farmacéuticos, el 60% de los medicamentos únicos de moléculas pequeñas se han construido por heterociclos nitrogenados y la síntesis de N-heterociclos representa más del 89% de esas reacciones en los laboratorios farmacéuticos (Martins et al., 2015) (Beinat et al., 2013). Entre los N-heterociclos descritos, se ha utilizado ampliamente en química medicinal, un homólogo rígido de piperazina con restricción conformacional (1S, 4S) -2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano (DBH), para sintetizar potentes fármacos (Murineddu et al., 2012). Un ejemplo de una molécula que contiene DBH es el antibiótico de fluoroquinolona danofloxacino (Braish T. F., 2009). Durante los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estado profundamente involucrado en la síntesis de moléculas con DBH funcionalizado para la investigación farmacéutica (López-Ortiz et al., 2010) (López-Ortiz et al., 2014). En 2007, Merck Research Laboratories descubrieron inhibidores potentes y selectivos de la histona deacetilasa 1 (HDAC) con actividades antitumorales que contenían en su estructura un DBH (Hamblett et al., 2007). Sorprendentemente, no se ha hecho más investigación hasta ahora para explorar el potencial de estas moléculas (1S, 4S) -2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano. En los últimos tiempos, la funcionalidad de los ditiocarbamatos ha sido empleada con éxito para diseñar compuestos anticancerosos potenciales con capacidad para inducir apoptosis (Hou et al., 2006) (Wang et al., 2011) (Cao et al., 2005) (Huang et al., 2009) (Zahran et al., 2014) (Gaspari et al., 2006) (Gerhäuser et al., 1997) (Hou et al., 2011) (Zheng et al., 2013) (Altıntop et al., 2016). Por lo tanto, basándose en la suposición de la construcción de un compuesto híbrido, constituido por la estructura (1S, 4S) -2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano y un farmacóforo de ditiocarbamato, podría conducir a moléculas con propiedades anticancerígenas deseables sin tener ningún efecto necrótico tanto en el tumor como en el tejido normal, por lo que en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa y citotóxica (necrótica) *in vitro* de los nuevos derivados de DBH-ditiocarbamato, el tert-butyl (1S,4S)-5-((methylthio) carbonothioyl) - 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxylate (**SL-29**),

el tert-butyl (1S,4S)-5-((benzylthio) carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-11**) y el tert-butyl (1S,4S)-5-(((pyridin-2-ylmethyl)thio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (**LS-12**). Con respecto a los resultados obtenidos, éstos establecen que los tres compuestos presentan actividad antiproliferativa en las células CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1, sugiriendo que estos compuestos no son específicos para un tipo de tumor. Sin embargo, los valores de IC50 obtenidas para las células tumorales en cada uno de los compuestos, indican que existe una diferencia en la sensibilidad que tienen las células en respuesta a los compuestos, por ejemplo, las células MDA-MB-231 mostraron mayor sensibilidad al efecto antiproliferativo de los compuestos, con respecto a las células CaSki y SK-LU-1, mientras que para las células CaSki fue lo contrario.

Con respecto a la relación estructura-función, nuestros resultados establecen que el grupo metiltio, presente en el SL-29, incrementó la actividad antiproliferativa en las células MDA-MB-231, sugiriendo que este grupo funcional es importante para la actividad antiproliferativa en estas células, mientras que el grupo benciltio y el grupo piridin-2-metiltio presente en el SL-11 y en el SL-12 respectivamente, incrementaron la actividad antiproliferativa en las células MDA-MB-231 y SK-LU-1, sugiriendo que estos grupos funcionales podrían presentar una actividad antiproliferativa en diferentes tipos de cáncer. No obstante, las diferencias observadas en la actividad antiproliferativa de los tres compuestos, el SL-29 y el SL-12 no indujeron actividad necrótica en las células tumorales, sugiriendo que el decremento en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. Sin embargo, el SL-11 indujo un 23% de necrosis en la línea celular MDA-MB-231 indicando que el grupo funcional benciltio presente en este compuesto, podría ser importante en la actividad necrótica de este compuesto. En cuanto al efecto antiproliferativo y necrótico en las células no tumorales (linfocitos humanos), el SL-29 y el SL-12 inhibieron el potencial proliferativo de estas células en más del 90%, indicando que estos compuestos no son selectivos. Sin embargo, el SL-11 inhibió la proliferación de linfocitos en un 63% a la concentración de 294 µg/ml, mientras que a las concentraciones de 57 y 69 µg/ml, la inhibición fue de 49 y 57%, sugiriendo que el SL-11 afecta en menor grado el potencial proliferativo de las células normales, considerando que, en las células tumorales el efecto antiproliferativo es a las 24 h mientras que en las células linfocíticas es a las 72 h, indicando también que el grupo funcional benciltio presente en el SL-11 es importante para la actividad antiproliferativa de este compuesto en células linfocíticas. Además, los tres compuestos no

presentaron actividad necrótica en las células linfocíticas, indicando que el decremento observado en el número celular es debido a una causa diferente a la muerte necrótica. Es importante resaltar que los compuestos que actualmente se usan para el tratamiento del cáncer, se caracterizan por presentar una actividad antiproliferativa, necrótica y de baja selectividad, donde los efectos colaterales pueden ser leves o severos dependiendo de la concentración o frecuencia de su administración, cuya relación con la actividad necrótica es directa. En este sentido, en este trabajo, se muestra a tres compuestos con actividad antiproliferativa, de baja o nula actividad necrótica y solo uno (SL-11) presenta cierta actividad selectiva. Este compuesto resulta de suma importancia ya que el no presentar una fuerte actividad necrótica, sugiere que los efectos colaterales relacionados directamente con esta actividad serían mínimos además de indicar una aceptable tolerancia al ser suministrado. Estos resultados en conjunto hacen del SL-11, un adecuado candidato para ser evaluado en modelos *in vivo* y ser probado como un agente con potencial terapéutico en el tratamiento contra el cáncer. En relación con otros ditiocarbamatos, la estructura híbrida del SL-29, SL-11 y el SL-12 consistente en la estructura (1S, 4S) -2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano y un ditiocarbamato, nuestros resultados establecen que la actividad antiproliferativa se mantuvo en los tres compuestos, sin embargo, si son comparados con el disulfiram, el cual presenta IC<sub>50</sub> en diferentes líneas celulares en el rango de nanogramos a pocos microgramos, estos compuestos híbridos están muy por abajo en la actividad antiproliferativa en células tumorales, no obstante, la actividad necrótica es conservada en ambos grupos de compuestos (híbridos y ditiocarbamatos), los cuales son descritos con baja a moderada actividad necrótica. En lo referente al efecto en células no tumorales, existe poca información al respecto, nuestros resultados establecen que los compuestos híbridos pueden inhibir el potencial proliferativo de las células linfocíticas de una manera moderada a fuerte, mientras que en los ditiocarbamatos, comparando con el disulfiram, éstos afectan fuertemente la proliferación de estas células, sugiriendo que el estado híbrido favorece la acción selectiva y permite que estos compuestos sean un modelo de partida para generar compuestos cuyos cambios estructurales sean dirigidos a sintetizar compuestos con mejor actividad antiproliferativa, de menor actividad necrótica y con una mejor acción selectiva.

## Conclusión

- Los compuestos SL-11, SL-12 y SL-29 afectan la proliferación de las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 de manera dependiente de la dosis.
- Los compuestos SL-11, SL-12 y SL-29 no inducen muerte celular necrótica en las células tumorales CaSki, MDA-MB-231 y SK-LU-1 a sus respectivas  $CI_{50}$ .
- Los compuestos SL-12 y SL-29 inhiben la proliferación de las células linfocíticas humanas en más del 90% a 72h a las concentraciones de las  $CI_{50}$  obtenidas para las células tumorales.
- El compuesto SL-11 inhibe la proliferación de las células linfocíticas humanas en un 49 a 63 % a 72 h a las concentraciones de las  $CI_{50}$  obtenidas para las células tumorales.
- Los compuestos SL-11, SL-12 y SL-29 no inducen muerte celular necrótica en las células linfocíticas a las concentraciones de las  $CI_{50}$  obtenidas para las células tumorales.

## Bibliografía

- Aibar S., Celano C., Chambi M., Estrada S., Gandur N., Gande P., González C., González O., Grance G., Junin M., Kohen N., Molina J., Nuñez M., Sáenz M., Troncoso M. y Vallejos A. (2011). Manual de Enfermería Oncológica. Instituto Nacional del Cáncer, Argentina, Ed. Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, Pp. 6-29.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Warter P. (2008). Biología molecular de la célula, 5ª edición, España, Ed. Omega, Pp. 1-2, 1208.
- Algranti E., Buschinelli J., De Capitani E. (2010). Occupational lung cancer, J Bras Pneumol, Vol. 36, no. 6, 784 -794 pp.
- Alonso R., Lazcano P., Hernández Á. (2005). Cáncer cervicouterino: Diagnóstico, prevención y control, 2ª edición, México, Editorial Medica Panamericana, Pp. 251-253, 386.
- Amorín K. (2013). Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas. Rev Perú Med Exp Salud Pública; 30(1):85-92.
- Arce C., Bargalló E., Villaseñor Y., Gamboa C., Lara F., Pérez S. y Villarreal P. (2011). Oncoguía: cáncer de mama, Instituto Nacional de Cancerología, México, Pp. 78
- Altıntop M., Sever B., Akalın Ç., Kucukoglu K., Özdemir A., Soleimani S., Nadaroglu H., Kaplancıklı Z. (2016). Synthesis and evaluation of new benzodioxole-based dithiocarbamate derivatives as potential anticancer agents and hCA-I and hCA-II inhibitors. Eur. J. Med. Chem., 125, 190-196.
- Bala V., Gupta G. y Sharma V. (2014). Chemical and Medicinal Versatility of Dithiocarbamates: An Overview. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Vol. 14, no. 12, 1021-1032.
- Barrales-Cureño H., Farrera R., Reyes R., Hernández F., García A. y Chávez S. (2016). Generalidades del fármaco Taxol: una revisión sistemática, Revista Médica de la Universidad Veracruzana, Vol. 16, no. 1.
- Beinat C., Banister S., McErlean C., Kassiou M. (2013). A practical synthesis of (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane. Tetrahedron Lett. 54(39), 5345-5347.
- Boticario B. (2005). ¿Una alimentación sana puede prevenir el cáncer?, Anal. Real Acad. Nac. Farm., Vol. 71, 609-633 pp.

- Braish T. (2009). Synthesis of 2-methyl-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane, side chain to danofloxacin(1). *Org. Process. Res. Dev.*, 13(2), 336-340.
- Bucher N. y Britten C. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *British Journal of Cancer*, 98:523–528.
- Campbell N. y Reece J., (2007). *Biología*, 7ª edición, España, Ed. Médica Panamericana, Pp. 229.
- Cao S., Feng Y., Jiang Y., Liu S., Ding G., Li R. (2005). Synthesis and in vitro antitumor activity of 4(3H)-quinazolinone derivatives with dithiocarbamate side chains. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15(7), 1915-1917.
- Cen D., Gonzalez R., Buckmeier J., Kahlon R., Tohidian N., Meyskens F. (2002) Disulfiram induces Apoptosis in Human Melanoma cells: a redox-related process. *Molecular Cancer Therapeutics* 1:197-204.
- Chen D., Cui Q., Yang H. y Dou P. (2006). Disulfiram, a Clinically Used Anti-Alcoholism Drug and Copper-Binding Agent, Induces Apoptotic Cell Death in Breast Cancer Cultures and Xenografts via inhibition of the Proteasome Activity. *Cancer Research*, (66): 10425-10433.
- Cooper G. y Hausman R. (2009). *The Cell: A Molecular Approach*, 5ª edición, Estados Unidos: Sinauer Associates Inc., Pp. 650.
- Gal B., López M., Martín A. y Prieto J. (2007). *Bases de la Fisiología*, 2ª edición, España, Ed. Tebar, Pp. 12-13.
- Gaspari P., Banerjee T., Malachowski W., Muller A., Prendergast G., DuHadaway J., Bennett S., Donovan A. (2006). Structure-activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.*, 49(2), 684-692.
- Gerhäuser C., You M., Liu J., Moriarty R., Hawthorne M., Mehta R., Moon R. y Pezzuto J. (1997). Cancer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes. *Cancer Res.*, 57(2), 272-278.
- Hamblett C., Methot J., Mampreian D., Sloman D., Stanton M., Kral A., Fleming J., Cruz J., Chenard M., Ozerova N., Hitz A., Wang H., Deshmukh S., Nazef N., Harsch A., Hughes B., Dahlberg W., Szewczak A., Middleton R., Mosley R., Secrist J., Miller T.

- (2007). The discovery of 6-amino nicotinamides as potent and selective histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17(19), 5300-5309.
- Hanahan D. y Weinberg R. (2000). The hallmarks of cancer, USA. *Cell*, 100 (1), 57-70.
  - Hou X., Ge Z., Wang T., Guo W., Cui J., Cheng T. Lai C. y Li R. (2006). Dithiocarbamic acid esters as anticancer agent. Part 1: 4-substituted-piperazine-1-carbodithioic acid 3-cyano-3,3-diphenyl-propyl esters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(16), 4214-4219.
  - Hou X., Ge Z., Wang T., Guo W., Wu J., Cui J., Lai C., Li R. (2011). Synthesis and structure-activity relationships of a novel class of dithiocarbamic acid esters as anticancer agent. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 344(5), 320-332.
  - Huang W., Ding Y., Miao Y., Liu M., Li Y., Yang G. (2009). Synthesis and antitumor activity of novel dithiocarbamate substituted chromones. *Eur. J. Med. Chem.*, 44(9), 3687-3696.
  - INEGI (2015). Consulta interactiva de datos. Estadísticas de mortalidad. Consultada el 27 de febrero del 2017. Disponible en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
  - Kamal A., Sathish M., Lakshma N., Srinivasulu V., Kavitha B., Tangella Y., Thummuri D., Bagul C., Shankaraiah N., Nagesh, N. (2015). Design and synthesis of dithiocarbamate linked  $\beta$ -carboline derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.037>
  - Karp G., (2011). *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, 6ª edición, China, Ed. Mc Graw Hill Interamericana, Pp. 651.
  - Khan S., Smita S., Mathur T., Upadhyay D., Rattan A. (2007). Antifungal Potential of Disulfiram. *Japanese Journal of Medicinal Mycology*. 48:109-113.
  - Kumar S. y Weaver V. (2009). Mechanics, malignancy and metastasis: The force journey of a tumor cell, *Cancer Metastasis Rev*, Vol. 28, no 1-2, 113-127.
  - Lagunas C., Valle M. y Soto C. (2014). Ciclo celular: mecanismos de regulación, *Vertientes: Revista Especializada en Ciencias de la Salud, México, UNAM*. 17 (2):98-107.
  - López M. (2003). La regulación del ciclo celular y el cáncer. México, *Revista especializada en Ciencias de la Salud*, 6(1):40-44.
  - López-Ortíz M., Herrera-Solís A., Luviano-Jardón A., Reyes-Prieto N., Castillo I., Monsalvo I., Demare P., Méndez-Díaz M., Regla I., Próspero-García O. (2010)



Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylricinoleic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20(11), 3231-3234.

- López-Ortiz M., Monsalvo I., Demare P., Paredes C., Mascher D., Hernández C., Hernández M., Regla I. (2014). Synthesis of ranolazine derivatives containing the (1S,4S)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane moiety and their evaluation as vasodilating agents. *Chem. Biol. Drug. Des.*, 83(6), 710-720.
- Markowitz S. (2007). Aspirin and colon Cancer-Targeting Prevention. *The new England journal of medicine*. 356:2195-2198.
- Martins P., Jesus J., Santos S., Raposo L., Roma-Rodrigues C., Baptista P., Fernandes A. (2015). Heterocyclic anticancer compounds: recent advances and the paradigm shift towards the use of nanomedicine's tool box. *Molecules*, 20(9), 16852-16891.
- Moctezuma V. y Patiño Z. (2009). Cáncer de pulmón. *Rev. Anales de Radiología México*; 1:33-45.
- Murineddu G., Asproni B., Pinna G., Curzu M., Dore A., Pau A., Deligia F., Pinna G. (2012). Synthesis of biologically active bridged diazabicycloheptanes. *Curr Med Chem.*, 2012,19(31), 5342-5363.
- National Cancer Institute (2012), National Institutes of Health. U.S.A. Consultada: 25 de Febrero del 2012, Disponible en: <http://www.cancer.gov/>
- OMS. Consulta virtual de datos. Estadísticas de mortalidad 2015. Consultada el 27 de febrero de 2017. [www.who.int/es](http://www.who.int/es)  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/es/>
- Pierce B. (2010). *Genética: Un enfoque conceptual*, 3ª edición, España, Ed. Médica Panamericana, Pp.10.
- Preston R. y Williams G. (2005). DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard, *Crit. Rev. Toxicol.* 35, 673–683.
- Tirado G., Betancourt M., Cervantes L., Carrancá G., Marina F., Borges G. (2005). Factores de riesgo de cáncer cervicouterino invasor en mujeres mexicanas, *Salud pública de México*, Vol. 47, no. 5, 342- 350 pp.
- Quah B. y Parish C. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments JoVE*, 44: 2259.



- Quah B. y Parish C. (2012). New and improved methods for measuring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo using CFSE-like fluorescent dyes. *Journal of Immunological Methods*, 379 (1): 1–14.
- Quezada R. (2007). El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y cómo es regulado en células troncales embrionarias, México, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, *Contactos* 65, 5-12.
- Ramírez J. y González C. (2003). Acido desoxirribonucleico, DNA (1). En: Jiménez L. y Merchant H; (2003). *Biología celular y molecular*, 1ª edición, México, Ed. Pearson Educación, Pp. 595.
- Sánchez S. (2001). Mecanismos Reguladores de la Muerte Celular no Necrótica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 20 (4): 266-274.
- Serman F. (2002). Cáncer cervicouterino: epidemiología, historia natural y rol del virus papiloma humano. perspectivas en prevención y tratamiento, *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, Vol. 67, no 4, 318-323.
- Smirnova A., Lazebnik L., Trubitsina I., Tkachenko E., Varvarina G., Drozdov V., Kim V., Baryshnikova A., Sokolova Z. (2012). Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksp Klin Gastroenterol*. 5: 66-69.
- Wai-Yin S., Zhang M., Li D., Li M., Sze-Tsai W. (2016). Enhanced anti-cancer activities of a gold (III) pyrrolidinedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework, *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 163, 1-7.
- Wang C. y Youle R. (2009). The role of mitochondria in apoptosis, *Annu Rev Genet*, 43:95-118.
- Wang X., Xu H., Guo L., Zheng J., Xu B., Guo X., Zheng C., Liu H. (2011). Synthesis and in vitro antitumor activity of new butenolide-containing dithiocarbamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21(10), 3074-3077.
- Wiggins M., Brouwers S., Davies J., Loveday T. (2014). Trait-based cue Utilization and initial skill acquisition: implications for models of the progression to expertise. *Front Psychol*, 5:541.
- Xueling H., Zemei G., Tingmin W., Wei G., Jingrong C., Tieming C., Chingshan L. y Runtao L. (2006). Dithiocarbamic acid esters as anticancer agent. Part 1: 4-Substituted-

piperazine-1-carbodithioic acid 3-cyano-3,3-diphenyl-propyl esters. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, China.

- Zahran M., Gamal-Eldeen A., El-Hussieny E., Agwa H. (2014). Thalidomide dithiocarbamate and dithioate derivatives induce apoptosis through inhibition of histone deacetylases and induction of caspases. *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 12(1), 65-70.
- Zheng Y., Duan Y., Ma J., Xu R., Zi X., Wang M., Ye X., Zhu S., Mobley D., Zhu Y., Wang J., Li J., Wang Z., Zhao W., Liu H. (2013). Triazole-dithiocarbamate based selective lysine specific demethylase 1 (LSD1) inactivators inhibit gastric cancer cell growth, invasion, and migration. *J. Med. Chem.*, 56(21), 8543-8560.