



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**Diseño, síntesis y evaluación de nuevos carbamatos bencimidazólicos
como inhibidores de la polimerización de la
 β -tubulina**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. LUCIA CANO GONZÁLEZ

Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México CDMX, abril 2018



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Vocal	Dr. Javier Ambrosio Hernández
Vocal	Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez
Secretario	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

El trabajo se realizó en los siguientes lugares: laboratorio 122, Edificio E de la Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección del Dr. Rafael Castillo Bocanegra; laboratorio 206, Edificio F de la Facultad de Química, UNAM, bajo la supervisión del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes; Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Unidad Xochimilco, bajo la supervisión del Dr. Ignacio González Sánchez; y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN siglo XXI, IMSS, bajo la supervisión de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

DEDICATORIAS

A mis padres Dionicio y Antonia

Muchas gracias por su incondicional apoyo para alcanzar mis objetivos. Por su comprensión y paciencia, a pesar de las diferencias. Porque siempre están conmigo y por todo lo que me han enseñado, les debo tanto. Están siempre en mi corazón. Los amo y siempre lo haré.

A mis hermanas Laura, Vero y Eva

Muchas gracias porque no me han dejado ni un solo momento. Porque en ustedes siempre encuentro cariño, apoyo, confianza y alegría. Nunca dejen de perseguir sus sueños y gracias por apoyar los míos. Siempre juntas las cuatro. Las amo mis hermanas.

A Israel

Muchas gracias por todo este tiempo y kilómetros que juntos hemos recorrido. Por escucharme y motivarme para seguir avanzando. Por tu gran apoyo para alcanzar este objetivo, por todos los cafés y todas las miradas. Te amo tanto.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por brindarme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional y personal. Así como el apoyo al proyecto DGAPA PAPIIT IN221416.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 738111 otorgada para la realización de mis estudios de maestría, No. becario 596643, y por el apoyo al Proyecto 251726. Al Posgrado en Ciencias Químicas por el apoyo económico para la asistencia al 52° Congreso Mexicano de Química.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por los consejos y enseñanzas para fortalecer mi formación. A la Dra. Alicia Hernández Campos por todo su apoyo en este proyecto.

A los miembros del jurado por el tiempo que emplearon en revisar este trabajo y sus valiosas recomendaciones que me hicieron para mejorarlo.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por enorme apoyo, enseñanzas, confianza y por permitirme integrar a su laboratorio. Muchas gracias por hacer posible la continuación de este proyecto.

Al Dr. Ignacio González Sánchez por todas sus enseñanzas que contribuyeron a mi formación, las asesorías, los consejos y por todo su tiempo.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia por su valioso apoyo que brindó para la realización de este trabajo, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por todos sus consejos y sugerencias.

Al Dr. Félix Matadamas Martínez por su tiempo, enseñanzas, por todo lo que has aportado para mi formación profesional y personal.

A la Dra. Laura Domínguez Dueñas por los grandes aportes y el tiempo que ha dedicado al proyecto. A su grupo de trabajo, especialmente a la Q. Dulce C. Guzmán y al M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz. Muchas gracias Rodrigo por compartir el desarrollo de este proyecto y el esfuerzo para alcanzar los objetivos, por tu interés, apoyo y amistad.

Al Dr. Miguel Flores Ramos por apoyarme con experimentos de Resonancia Magnética Nuclear y a Diego Cruz por Espectrometría de Masas.

Al Dr. José Guadalupe López Cortés y a sus alumnos por su contribución con experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Dr. José Pedraza Chaverri y a sus alumnos por permitirme utilizar equipos de su laboratorio.

A los profesores del Laboratorio de Química Farmacéutica, M. en C. Maria Eugenia Mendoza Jasso y QFB Mario Díaz Ortiz, por la donación de diversas anilinas.

A mis compañeros del laboratorio 206-F, amigos gracias por su gran apoyo y por integrarme a su grupo: Brenda Hernández, Nadia Rivero, Alejandra Cabrera, Carlos Páez, Gladys Molina, Valeria Rodríguez, Isabel Coronado, Araceli Chavez, Karol Almeida, Ofelia Limón, Kenia Morales, Luis Hernández, Carla Juárez, Irene Hernández; y, finalmente, a Ariana Romero por tu interés en el proyecto y tu trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, CMN siglo XXI, amigos gracias por su gran apoyo y contribuciones: Carolina Saucedo, Patricia Meza, Ada Martín, Gustavo Franco, Sandra Comparan y, muy especialmente a Félix Matadamas y Rocío Nieto.

A mis compañeros del laboratorio 122: Jorge Victoria, José Luis Zavala, Elkin Sanabria, Diana Prado y Francisco Barrera.

A mis amigos Anuar Flores, Victor Baeza, Sergio Ampudia, Thania Cuahutencos, Josué García, Alejandro Mendieta y Génesis Dehesa; también, con mucho cariño, a la familia Andrade Canales. Gracias por continuar compartiendo momentos juntos. Los quiero mucho.

¿Por qué contentarnos con vivir a rastras cuando sentimos el anhelo de volar? H. K.

El trabajo se presentó en los siguientes congresos:

“Diseño, síntesis y evaluación de nuevos carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina”. Cartel profesional. 52° Congreso Mexicano de Química y 36° Congreso Nacional de Educación Química, celebrado en Puerto Vallarta, Jalisco del 26 al 29 de septiembre 2017.

“Diseño, síntesis y evaluación de nuevos carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina”. Cartel. Tercer Simposio de Química Farmacéutica, realizado en la Facultad de Química, UNAM el 15 de junio de 2017.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN.....	v
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
III. ABREVIATURAS DE COMPUESTOS.....	ix
IV. ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Cáncer y su tratamiento.....	2
2.2. Microtúbulos.....	2
2.2.1. Dinámica de los microtúbulos.....	4
2.3. Agentes de unión a microtúbulos.....	5
2.4. Derivados de 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.....	9
2.5. Isoformas de β -tubulina.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17
5.1. Objetivo general.....	17
5.2. Objetivos particulares.....	17
6. METODOLOGÍA.....	18
6.1. Derivados de 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo	18
6.2. Síntesis química.....	18
6.2.2. Síntesis de los carbamatos bencimidazólicos PCZ1 – PCZ6.....	18
6.3. Análisis de la actividad biológica <i>in vitro</i>	19
6.3.1. Evaluación de la viabilidad celular.....	19
6.3.2. Ensayo de inhibición de la polimerización de la tubulina.....	20
6.3.3. Análisis por <i>Western blot</i> de la tubulina soluble y polimerizada.....	21
6.3.4. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta.....	22

6.3.5. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta.....	23
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
7.1. Derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.....	24
7.2. Síntesis química.....	28
7.2.1. Análisis retrosintético.....	28
7.2.2. Síntesis de los carbamatos bencimidazólicos PCZ1 – PCZ6.....	29
7.2.3. Ciclocondensación: Síntesis del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (2).....	30
7.2.4. S _E Ar: 5-clorosulfonil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (3).....	31
7.2.5. Síntesis de los productos finales (PCZ1-PCZ6).....	33
7.3. Análisis de la actividad biológica <i>in vitro</i>	41
7.3.1. Determinación de la actividad citotóxica	41
7.3.2. Ensayo de inhibición de la polimerización de la tubulina	45
7.3.3. Análisis por <i>Western blot</i> de la tubulina soluble y polimerizada	46
7.3.4. Análisis de la distribución de la β-tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta.....	48
7.3.5. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta.....	51
8. CONCLUSIONES.....	54
9. PERSPECTIVAS.....	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXO I. DERIVADOS DEL 1<i>H</i>-BENCIMIDAZOL-2-ILCARBAMATO DE METILO	65
ANEXO II. SÍNTESIS QUÍMICA.....	67
II.1. Metodología experimental.....	67
II.1.1. Instrumentación.....	67
II.1.2. Reactivos, disolventes y procedimientos generales.....	68
II.1.2.1. Ciclocondensación: 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (2).	68
II.1.2.2. S _E Ar: 5-clorosulfonil-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (3)	69
II.1.2.3. Procedimiento general para la obtención de las sulfonamidas.....	69
II.1.2.4. [5-(fenilsulfamoil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).....	70

II.1.2.5. {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).....	70
II.1.2.6. {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).....	71
II.1.2.7. {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).....	71
II.1.2.8. {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5).....	72
II.1.2.9. {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).....	72
II.2. Espectros.....	73
ANEXO II. 6.3. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>	100
III.1. Metodología experimental.....	100
III.1.1. Cultivo celular.....	100
III.1.2. Preparación de soluciones.....	100
III.1.2.1. PBS.....	101
III.1.2.2. PBS-EDTA.....	101
III.1.2.3. Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).....	102
III.1.2.4. Medio de congelación	102
III.1.2.5. Solución de MTT (2.5 mg/mL).....	103
III.1.2.6. Solución de XTT/PMS.....	103
III.1.2.7. Solución fijadora de paraformaldehído al 4%.....	103
III.1.3. Propagación de líneas celulares.....	104
III.1.4. Conteo celular con cámara de Neubauer.....	104
III.1.5. Congelar células.....	105
III.1.6. Descongelar células.....	106
III.1.7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)...	106
III.1.8. Diferenciación de células THP-1.....	107
III.1.9. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT.....	107
III.1.10. Ensayo de viabilidad celular mediante XTT.....	109
III.1.11. Ensayo polimerización de la tubulina.....	110

III.1.12. Análisis por <i>Western blot</i> (inmuno-electrotransferencia) de la tubulina soluble y polimerizada.....	111
III.1.13. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta	114
III.1.14. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta.....	115
III.2. Evaluación citotóxica en células SK-LU-1.....	116
III.3. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando la β -tubulina.....	118
III.4. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando la ciclina B.....	120

I. RESUMEN

Los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo, como el nocodazol, son compuestos con un gran potencial como tratamientos contra el cáncer y comprobada unión a la β -tubulina. Por estas razones, en el presente proyecto se diseñaron, sintetizaron y evaluaron *in vitro* seis nuevos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina de humano para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

Del estudio de la actividad citotóxica de los nuevos derivados se encontró un compuesto prometedor como *hit*. Este derivado PCZ4, presentó una CI_{50} cercana a 10 μ M en las líneas de cáncer estudiadas (11.7 μ M en SK-LU-1, 10.77 μ M en SW620 y 14.51 μ M en MCF-7); mientras que careció de actividad sobre los macrófagos TPH-1 empleados como control de citotoxicidad en células sanas.

En cuanto el efecto de PCZ4 sobre la polimerización de la β -tubulina en células SK-LU-1, este compuesto actúa como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos y produce un incremento en la cantidad de tubulina soluble en el citoplasma. De esta forma, al interferir con la dinámica de los microtúbulos, PCZ4 promueve la formación de células polinucleares, husos mitóticos multipolares y arresto del ciclo celular en fase G2/M.

Los resultados de la actividad citotóxica en células de cáncer, ocasionada por la interferencia en la polimerización de la β -tubulina, posicionan a PCZ4 como un compuesto de gran interés para el tratamiento del cáncer y continuar con la investigación en este tipo de moléculas.

II. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURAS	
Figura 2.1. Estructura de los microtúbulos.....	3
Figura 2.2. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	4
Figura 2.3. Clasificación de los MTAs según su efecto sobre la masa de tubulina polimerizada.....	6
Figura 2.4. Eventos celulares en respuesta a un tratamiento con MTAs.....	8
Figura 2.5. Estructuras químicas de compuestos derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.....	10
Figura 2.6. Sitio de unión del NZ en la β -tubulina.....	10
Figura 2.7. Compuestos de la serie LCG, MBZ, ABZ y FBZ, y su evaluación en la línea celular SK-LU-1.....	11
Figura 2.8. Representación y comparación de los aminoácidos que componen al sitio de unión propuesto de los carbamatos bencimidazólicos.	13
Figura 7.1. Zonas farmacofóricas del núcleo bencimidazol relevantes en la actividad antitumoral de los derivados.....	24
Figura 7.2. Partes de la estructura de los derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-carbamato de metilo.....	25
Figura 7.3. Relación de los desplazamientos químicos constantes en las moléculas de la serie PCZ en RMN ¹ H y RMN ¹³ C.....	34
Figura 7.4. Espectro COSY de PCZ4.....	38
Figura 7.5. Espectro del experimento HSQC de PCZ4.....	39
Figura 7.6. Espectro del experimento HMBC de PCZ4.....	39
Figura 7.7. Espectro NOESY de PCZ4.....	40
Figura 7.8. Cambios morfológicos en las células SK-LU-1 inducidos por los tratamientos NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M) a su Cl ₅₀ : 24, 48 y 72 h (20x).....	44
Figura 7.9. Inhibición de la polimerización de la tubulina <i>in vitro</i> por los compuestos Taxol 10 μ M, NZ 10 μ M, LCG1 10 μ M y PCZ1 50 μ M.....	45

Figura 7.10. Efecto en la polimerización de la tubulina por los compuestos NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M), a su Cl_{50}	47
Figura 7.11. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M) a su Cl_{50} , durante 24 h (40x).....	49
Figura 7.12. Cambios en la presencia de Ciclina B en células SK-LU-1 inducidos NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M) a su Cl_{50} , durante 24 h (40x).....	52

ESQUEMAS

Esquema 6.1. Ruta sintética para la obtención de los derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.....	19
Esquema 7.1. Análisis retrosintético para la obtención de los derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.....	28
Esquema 7.2. Reacción de ciclocondensación para la obtención del intermediario 2	30
Esquema 7.3. Sustitución Electrofílica Aromática para la obtención del intermediario 3	32
Esquema 7.4. Reacción de sustitución para la obtención de los compuestos finales PCZ1-PCZ6.	33

TABLAS

Tabla 2.1. Isoformas de β -tubulina y su distribución en tejidos normales de un adulto.....	12
Tabla 2.2. Cambios en la distribución de isoformas de β -tubulina en varios tipos de cáncer.....	13
Tabla 6.1. Serie de nuevos derivados del 1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (serie PCZ)	18

Tabla 7.1. Propiedades moleculares de los derivados bencimidazólicos.....	26
Tabla 7.2. Rendimientos de las reacciones involucradas en la síntesis de los compuestos PCZ.....	29
Tabla 7.3. Constantes físicas de los intermediarios aislados y productos finales.....	29
Tabla 7.4. Constantes espectroscópicas y espectrométricas del intermediario 2	30
Tabla 7.5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de 3a	31
Tabla 7.6. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos de la serie PCZ.....	34
Tabla 7.7. Resultados de actividad citotóxica en líneas celulares.....	41

III. ABREVIATURAS DE COMPUESTOS

ABZ	Albendazol
ABZSO(+)	Sulfóxido de albendazol (+)
ABZSO(-)	Sulfóxido de albendazol (-)
FBZ	Fenbendazol
FBZSO(+)	Sulfóxido de fenbendazol (+)
FBZSO(-)	Sulfóxido de fenbendazol (-)
MBZ	Mebendazol
NZ	Nocodazol
PCZ1	[5-(fenilsulfamoil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
PCZ2	{5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
PCZ3	{5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
PCZ4	{5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
PCZ5	{5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
PCZ6	{5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
LCG1	<i>N</i> -[5-(naftilen-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
MTAs	Agentes de unión a microtúbulos
CBZs	Derivados bencimidazólicos

IV. ABREVIATURAS DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	3 letras	1 Letra
Alanina	Ala	A
Cisteína	Cys	C
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Lisina	Lys	K
Leucina	Leu	L
Metionina	Met	M
Asparagina	Asn	N
Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q
Arginina	Arg	R
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Valina	Val	V
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de muerte y el mayor problema de salud. Tan solo en el año 2015, la Organización Mundial de la Salud registró 8,8 millones defunciones por cáncer en todo el mundo; en México, la cifra ascendió a 82,501 en 2016, siendo la tercera causa de muerte. Sin embargo, cada año estas cifras aumentan a pesar de los constantes avances en la búsqueda de nuevos tratamientos contra este padecimiento.

Actualmente, se han descrito diversas dianas biológicas para la búsqueda de terapias anticancerígenas más efectivas y seguras. Entre estos blancos, se destaca el monómero β de la tubulina, que conforma a los microtúbulos, por su impacto en diversas funciones celulares como la división y la mitosis.

La β -tubulina es una proteína que presenta diferentes isoformas con un complejo patrón de expresión en humanos. Entre las isoformas más relevantes se encuentran HsBT1 y HsBT3, sobreexpresadas en cáncer de pulmón, ovario y mama; y la isoforma HsBT6 solo en células hematopoyéticas.

Por otro lado, recientemente se co-cristalizó el nocodazol, un derivado del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, en la β -tubulina. Con ello se confirmó el sitio de unión de moléculas de este tipo y se promueve el estudio de nuevos derivados ya que han demostrado experimentalmente actividad antitumoral.

En este trabajo se sintetizaron seis nuevos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo diseñados como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos por interacción con la β -tubulina. Posteriormente, se evaluó el potencial de los nuevos derivados como posibles anticancerígenos y se estudió el mecanismo de acción por el cual actúan sobre células tumorales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer y su tratamiento

Según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales que pueden afectar cualquier región del cuerpo y propagarse hacia otros órganos.¹ A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de muerte¹ y el mayor problema de salud².

En el año 2015, la OMS registró 8,8 millones defunciones por cáncer en todo el mundo. Siendo los tipos con mayor impacto los siguientes: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario.¹ En el caso de México, el cáncer es la tercera causa de muerte con 82,501 defunciones en 2016.³ Sin embargo, cada año estas cifras aumentan a pesar de los constantes avances en la búsqueda de nuevos tratamientos contra este padecimiento.

En la actualidad hay un número creciente de opciones terapéuticas, pero su empleo depende del tipo de cáncer que presente el paciente. Entre los tratamientos mayormente utilizados se encuentra la cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal y la terapia dirigida.^{4,5} De ellas destacan las terapias dirigidas puesto que se caracterizan por bloquear rutas bioquímicas esenciales o proteínas implicadas en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas específicamente.⁶

Uno de los blancos notables de las terapias dirigidas son los microtúbulos,^{7,8} los cuales se han estudiado ampliamente y existen diversos tipos de compuestos que son empleados para el tratamiento del cáncer.⁹ Estos agentes pueden promover la polimerización o despolimerización de los microtúbulos.¹⁰

2.2. Microtúbulos

Los microtúbulos son biopolímeros cilíndricos cuyo diámetro interno es de 25 nm y longitud variada.¹¹ Estas estructuras tienen un arreglo lineal constituido por la unión lateral de trece protofilamentos (Figura 2.1) que provienen de la polimerización de heterodímeros de α - y β -

tubulina, proteínas globulares con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa cada una.¹⁰⁻
¹² La terminal del protofilamento donde se localizan las α -tubulinas corresponde a la terminal negativa (-); mientras que el extremo contrario, de las β -tubulinas, es la terminal positiva (+).^{7,12}

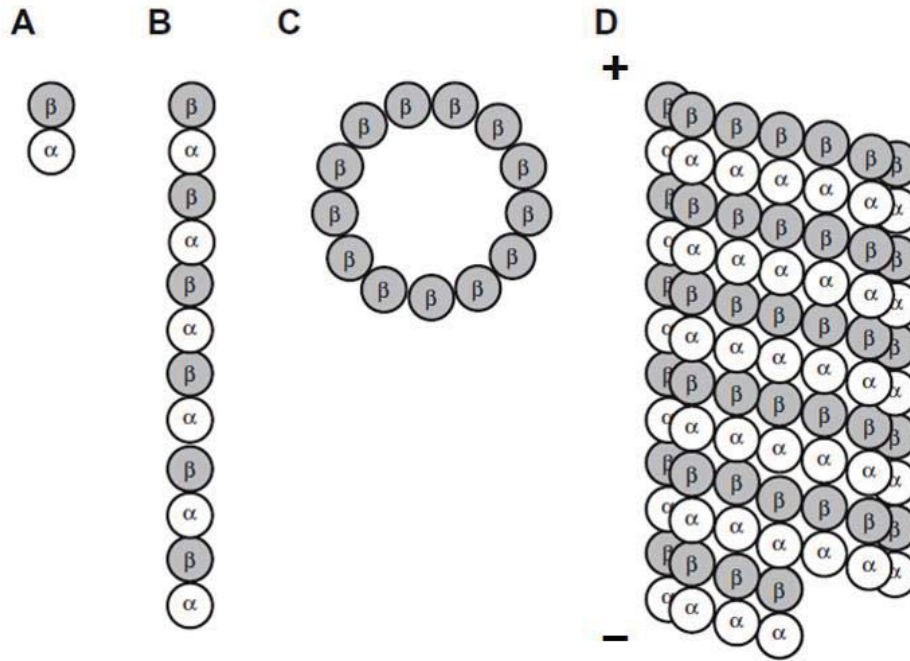


Figura 2.1. Estructura de los microtúbulos. (A) Los heterodímeros de α/β -tubulina se polimerizan para formar (B) protofilamentos. (C y D) Trece protofilamentos crean, por contacto lateral, la estructura de cilindro hueco de los microtúbulos, con la β -tubulina expuesta en la terminal (+) y α -tubulina en la terminal (-).¹²

Cada heterodímero contiene dos sitios de unión a nucleótidos de guanina (GDP/GTP); uno localizado en la subunidad α , donde se une una molécula de GTP de manera irreversible y no hidrolizable, llamado sustrato no-intercambiable (sitio-N). El segundo sitio se encuentra en la subunidad β , allí se une GTP y puede ser intercambiado por GDP (sitio-E). Además se encuentran asociados iones de Mg^{2+} que interactúan con los nucleótidos de guanina.¹³⁻¹⁵

Los microtúbulos son estructuras ampliamente relevantes en la supervivencia de las células dada su participación en diversos procesos, tales como mantenimiento de la forma de la célula, movimiento, transporte y en la división celular.^{7,10} Es debido al papel vital que juegan durante la división celular y la mitosis que los microtúbulos son un blanco atractivo en el diseño de nuevos fármacos contra el cáncer.¹³

2.2.1. Dinámica de los microtúbulos

En las células, el arreglo de los microtúbulos es altamente dinámico, es decir, pueden ensamblarse, desensamblarse y reorganizarse en tiempos que van desde segundos a minutos.¹¹ La dinámica de los microtúbulos *in vivo* se ha descrito a través de dos mecanismos distintos: inestabilidad dinámica e intercambio rotatorio (*treadmilling*).^{7,16} En el primero, la adición y pérdida de subunidades de tubulina se lleva a cabo en la misma terminal del microtúbulo; en cambio, en el intercambio rotatorio, la ganancia de tubulina ocurre en la terminal (+) y la pérdida en la terminal (-).¹⁶

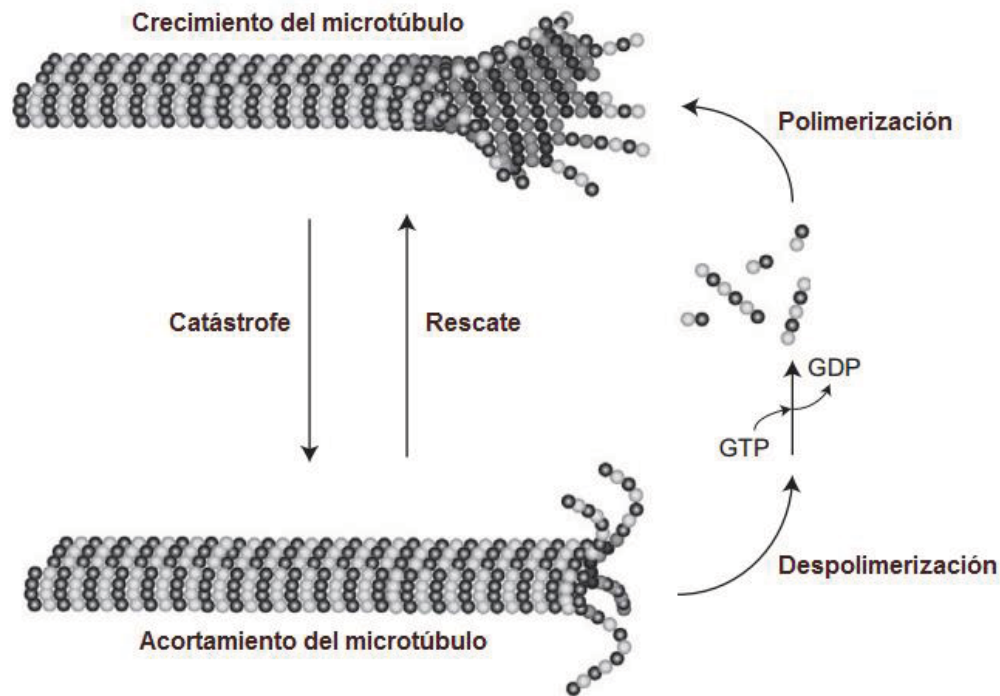


Figura 2.2. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. El GTP-unido a la tubulina se ensambla a la terminal (+) previniendo la despolimerización de los microtúbulos. Cuando el GTP se hidroliza, el microtúbulo se vuelve inestable y se despolimeriza por protofilamentos individuales curvados hacia afuera, los cuales lideran la desestabilización de la estructura de los microtúbulos. Finalmente, el GDP se sustituye por GTP en el desensamblamiento de la subunidad de tubulina, iniciando otra vez el ciclo.^{15,16}

En la inestabilidad dinámica, la polimerización del microtúbulo ocurre cuando cada uno de los monómeros α (sitio-N) y β (sitio-E) unen GTP. Después, el GTP se hidroliza a GDP en la subunidad de β -tubulina, queda unido a la misma, se vuelve menos estable y tiende a adoptar una conformación curva (forma-D) que favorece la despolimerización (Figura 2.2). La hidrólisis

del GTP se ve favorecida por la incorporación de un nuevo heterodímero, pero solo ocurre en la penúltima subunidad adicionada formando una capa β -tubulina-GTP. En la despolimerización se pierde la capa β -tubulina-GTP, siguiendo con la apertura del sitio del GDP y los protofilamentos se abren hacia afuera liberándose los heterodímeros en el citoplasma. El GDP se une a la β -tubulina libre y puede intercambiarse por GTP en el sitio E, iniciando otra vez el ciclo.¹⁵⁻¹⁸

La dinámica de los microtúbulos puede alternarse dramáticamente de un rápido crecimiento o acortamiento. La transición de un repentino cambio en el crecimiento de un microtúbulo a acortamiento se denomina “catástrofe”, mientras que el evento inverso se conoce como “rescate”.^{7,11,16,17}

La habilidad de los microtúbulos de polimerizarse y despolimerizarse es determinante para el adecuado progreso de la división celular y segregación de los cromosomas durante la mitosis, en este momento son 100 veces más dinámicos que durante la interfase.¹¹ Es por esta razón que la supresión de la dinámica de los microtúbulos de células tumorales, las conduce a su muerte; este mecanismo es común en moléculas que bloquean la mitosis.¹⁹

Por tanto, ya que los microtúbulos y su dinámica juegan un rol crítico en la mitosis,^{7,20} son un blanco atractivo en el diseño de moléculas para atacar el cáncer, a través de la interferencia en su dinámica.¹⁹

2.3. Agentes de unión a microtúbulos

En la actualidad, existe una amplia variedad de moléculas que se unen a la tubulina e interrumpen la dinámica de los microtúbulos.⁹ Este tipo de compuestos son conocidos como agentes de unión a microtúbulos (MTAs, por sus siglas en inglés: *microtubule-targeting agents*) o agentes de unión a tubulina (TBAs, por sus siglas en inglés: *tubulin-binding agents*).

De acuerdo con el efecto que producen sobre la polimerización a una concentración relativamente alta, los MTAs pueden ser clasificados en dos grupos (Figura 2.3):^{7,19}

- a) Agentes estabilizadores de los microtúbulos. Estos compuestos estimulan la polimerización de los microtúbulos. Se incluye a los taxanos, las epotilonas y la laulimalida.
- b) Agentes desestabilizadores de los microtúbulos. Inhiben la polimerización de los microtúbulos; en este grupo se incluyen los alcaloides de la vinca, análogos a la colchicina, rizoxina y derivados bencimidazólicos como el nocodazol (NZ).

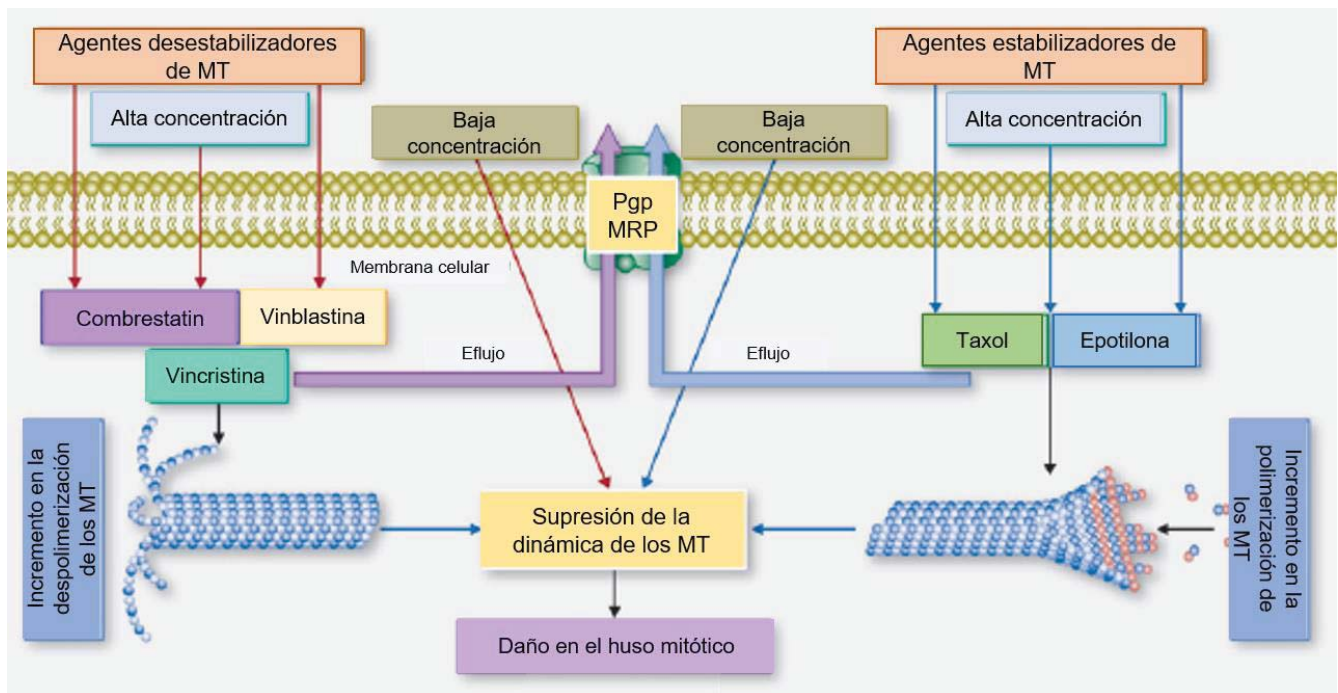


Figura 2.3. Clasificación de los MTAs según su efecto sobre la masa de tubulina polimerizada. Los MTAs estabilizan o desestabilizan los microtúbulos, con lo que interfieren en la dinámica de los microtúbulos.¹⁹

Los MTAs estabilizan o desestabilizan los microtúbulos dando como resultado la supresión de la dinámica de los microtúbulos y daño en el huso mitótico o daño masivo en la estructura de los microtúbulos, dependiendo de la concentración del compuesto y el tiempo de exposición.^{12,19} Debido a su efecto sobre la formación del huso mitótico aberrante, ambos tipos de compuestos conducen al arresto celular en la fase G2/M y desencadenan muerte celular por apoptosis.^{7,19}

Sin embargo, pese a los numerosos trabajos en esta área, aún no es claro el mecanismo por el cual se produce la muerte celular por apoptosis en células tratadas con MTAs.^{21,22} Por otro lado, se ha descrito la generación de células aberrantes por la interferencia en la dinámica de

los microtúbulos, este proceso es ampliamente relacionado con el mecanismo que promueve la muerte celular (Figura 2.4).^{19,21-23}

La generación de células aberrantes por MTAs procede desde la división celular. En un primer evento, la célula es detenida en mitosis prolongada debido a la activación crónica del punto de control del ensamble del huso mitótico (SAC, *spindle-assembly checkpoint*).^{22,24} Esta situación puede llevar a dos acontecimientos; en el primero, se activan mecanismos de muerte celular o mitótica; mientras que en el segundo la salida de la mitosis.^{21,22,25}

Si la célula consigue salir de la mitosis, puede sufrir dos fenómenos: 1) División aberrante, dada por la segregación irregular de los cromosomas y tiene por consecuencia la aparición de células aneuploides. 2) Entrada en la interfase por un proceso denominado escape mitótico (*mitotic slippage*), o bien, por la falla en la citocinesis; dando como resultado una célula tetraploide.^{21,22,24,25} En ambos fenómenos, las células resultantes son propensas a muerte celular programada por los errores generados durante su división; o bien, podrían volver a entrar en división y producir células multinucleadas (poliploides) o aneuploides potencialmente tumorigénicas.^{19,21,22,25}

Otro cambio que ocurre en el arresto mitótico inducido por los MTAs es la lenta degradación de la ciclina B.^{22,24} Por un lado, en un proceso de división celular normal, la expresión de la ciclina B se incrementa en la fase G2; posteriormente, sufre una degradación rápida vía ubiquitinización tras la desactivación de SAC, cuando han sido correctamente alineados los cromosomas, y promueve la progresión del ciclo celular en la mitosis.^{22,26,27} Por otro lado, cuando las células se encuentran en arresto mitótico, se mantiene una concentración elevada de ciclina B, ya que se degrada lentamente, aún con la activación crónica de SAC.^{19,22} La disminución de la ciclina B podría estar relacionada con el proceso de escape mitótico.²²

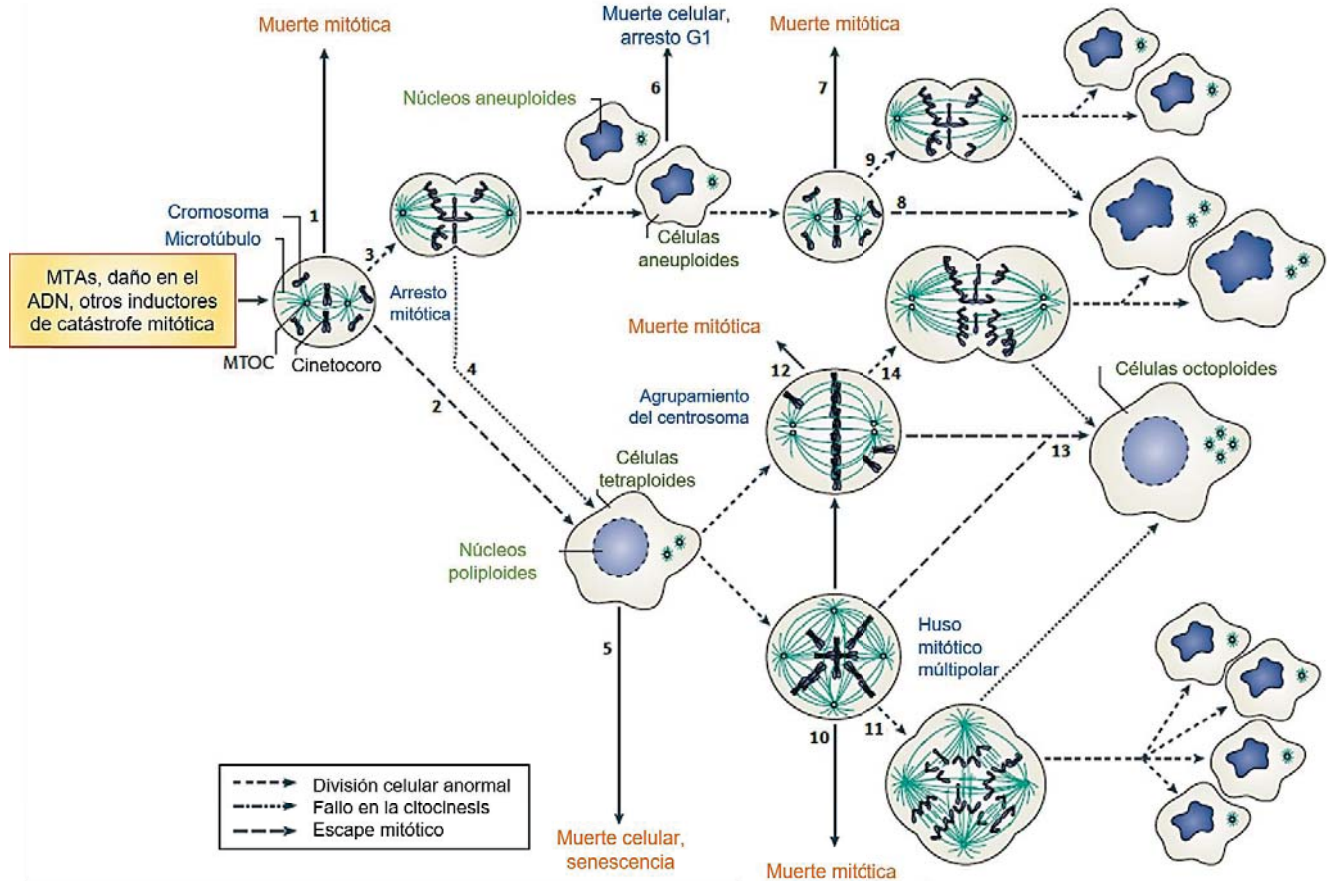


Figura 2.4. Eventos celulares en respuesta a un tratamiento con MTAs. Por interferencia en la dinámica de los microtúbulos, las células se detienen en la mitosis y, generalmente, se someten a muerte mitótica programada por catástrofe mitótica (1). Sin embargo, en algunos casos, las células escapan del arresto mitótico (*mitotic slippage*) y pasan a la siguiente interfase (2), sufren una mitosis aberrante (3), o bien, la división no se completa y la citocinesis falla (4). Tras la falla de citocinesis (4) y el escape mitótico (2) se generan células tetraploides, pero la mayoría muere o se vuelven senescentes (5). Cuando la división aberrante es productiva, se forman células aneuploides potencialmente tumorigénicas; aunque la mayoría no son viables debido a grandes reordenamientos cromosómicos que llevan a la muerte de las células arrestadas en G1 (6). En casos raros, estos aneuploides proliferan, pero son altamente susceptibles a muerte mitótica durante la siguiente fase M (7), escape mitótico (8) u otra mitosis aberrante (9). En algunos casos las células tetraploides proliferan, pero continúan siendo vulnerables a muerte mitótica (10) o divisiones multipolares (11) debido a su número de centrosomas. Alternativamente, las tetraploides pueden someterse a agrupamiento de centrosomas y sucumbir en muerte mitótica (12), experimentar escape mitótico (13) o desarrollar divisiones aberrantes (14), conduciendo a la generación de células hijas aneuploides potencialmente tumorales.²¹

Los MTAs son muy exitosos como fármacos anticancerígenos,⁷ aunque su aplicación va más allá de este padecimiento; en la actualidad los microtúbulos son estudiados como blanco

biológico en otras enfermedades como el Alzheimer.²⁸ Sin embargo, también hay reportes de desarrollo de resistencia por algunos tipos de MTAs, así como diversos efectos adversos.⁷ Por ejemplo, la resistencia desarrollada a los taxanos por expresión de la bomba de eflujo glicoproteína P asociada a la membrana;²⁹ y efectos adversos relacionados a la susceptibilidad de tejidos sanos que se dividen rápidamente, tales como los tejidos epitelial y hematopoyético.³⁰

Por estas razones, el desarrollo de nuevos MTAs continúa siendo un área importante en la búsqueda de fármacos anticancerígenos. Entre este tipo de compuestos destacan los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, puesto que son moléculas estructuralmente sencillas en comparación con agentes naturales,^{31,32} como el taxol y la vinblastina; además el campo de investigación en este tipo de compuestos es amplio.

2.4. Derivados de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

La importancia de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo comenzó desde su empleo como fármacos antiparasitarios;^{33,34} no obstante, en la actualidad se ha incrementado su estudio por su prometedor efecto antitumoral, como fue demostrado al inicio con los clásicos antiparasitarios (Figura 2.5): albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ), nocodazol (NZ) y fenbendazol (FBZ).³⁴⁻⁴⁰

Los resultados que avalan el efecto de estos compuestos son numerosos. Por ejemplo, el NZ tiene actividad contra varios tumores y leucemias;^{36,41} el ABZ inhibe la proliferación en varios tipos de cáncer, incluyendo hepatocelular y cáncer colorectal, así como una variedad de líneas celulares malignas encontradas en humano;³⁸⁻⁴⁰ el MBZ ha mostrado potentes efectos antitumorales en ambas células de cáncer de pulmón *in vitro* y en evaluaciones *in vivo* utilizando como modelo de estudio ratones;^{35,36} y el FBZ mostró actividad contra líneas celulares de cáncer de pulmón.³⁷

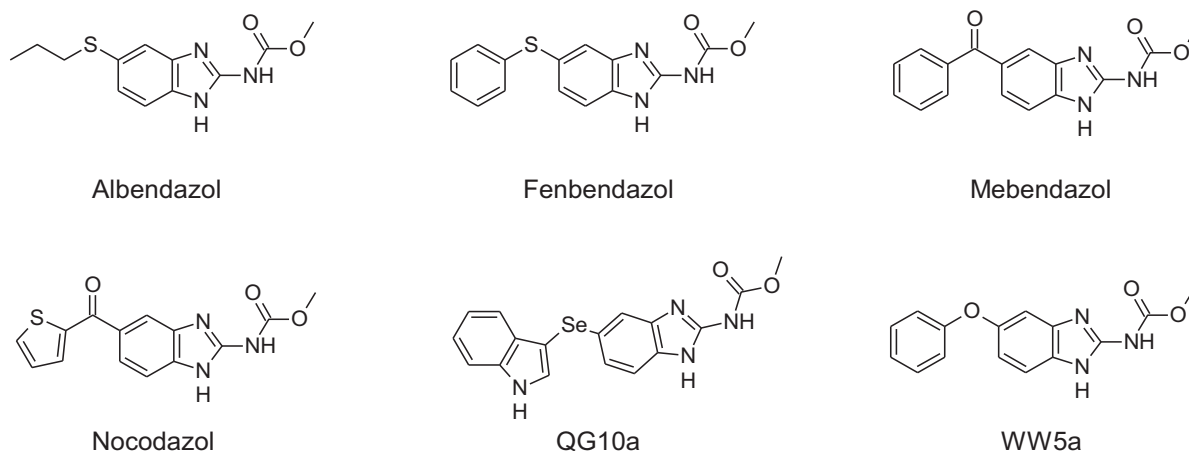


Figura 2.5. Estructuras químicas de compuestos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.

Posteriormente, se han reportado nuevos derivados de carbamatos bencimidazólicos, como los compuestos QG10a³⁶ y WW5a³⁴ (Figura 2.5), que inhiben la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer.

Otro avance relevante en el estudio de estos derivados fue la obtención de la estructura cristalográfica del NZ en su sitio de unión en la β -tubulina de *Gallus gallus* (PDB: 5CA1).⁴² Este sitio, cercano al de la colchicina, coincidió con el predicho por métodos computacionales reportados previamente.^{33,43} Asimismo, el modelo experimental sentó las bases para validación del modelo computacional, apoyo en la predicción del modo de unión de nuevos derivados y características estructurales fundamentales para su unión selectiva.⁴⁴

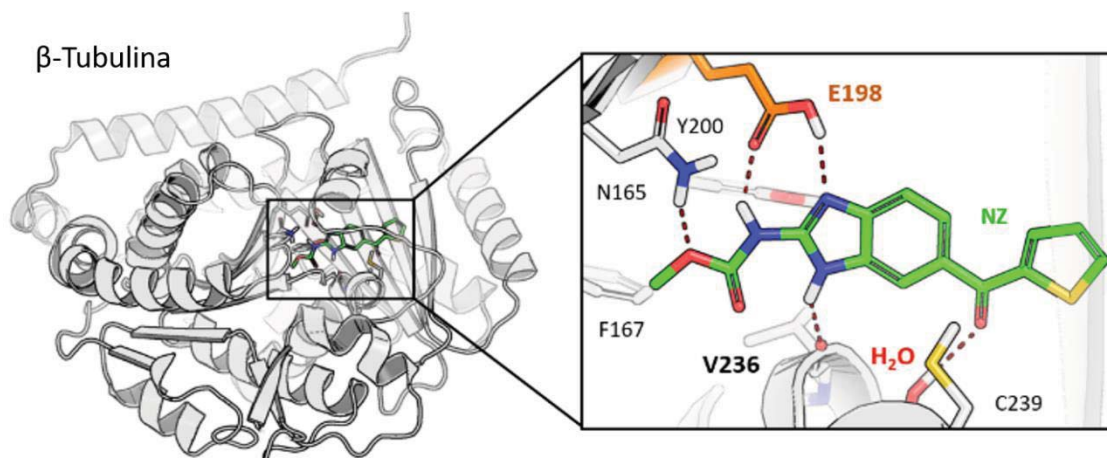
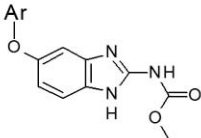


Figura 2.6. Sitio de unión del NZ en la β -tubulina (*G. gallus*). Los aminoácidos presentes en el sitio de unión del NZ son E198, N165, V236, Y200, F167 y C239. Posiblemente el E198 esté protonado y se encuentre una molécula de agua entre G235 y C239, ambos hechos podrían ser clave para la unión del NZ.⁴⁵

Dada la trascendencia del sitio de unión del NZ en el diseño de fármacos, se ha ampliado su caracterización y descripción de los residuos clave para su unión (Figura 2.6). Entre las interacciones ligando-proteína, la que establece el E198 es clave para la estabilización del NZ dentro del sitio, pues tan solo la pérdida de este puente de hidrógeno impide que se una adecuadamente;^{15,44} sin embargo, es probable que dicho residuo se encuentre protonado.⁴⁵ Por otro lado, la V236 es capaz de establecer puente de hidrógeno con el hidrógeno de bencimidazol; y la molécula de agua podría puentear una interacción entre la C239 y grupo carbonilo del sustituyente en posición 5(6), debido a la tautomería del bencimidazol.⁴⁵




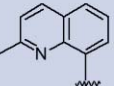
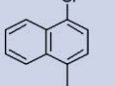


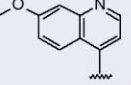
LCG	Ar	CI ₅₀ (μM)	LCG	Ar	CI ₅₀ (μM)	LCG	Ar	CI ₅₀ (μM)
1		0.076±0.005	3		1.46±0.103	5		0.63±0.001
2		1.47±0.054	4		2.09±0.102	6		7.93±0.268
MBZ		0.53±0.037	ABZ		0.49±0.026	FBZ		0.46±0.042

Figura 2.7. Compuestos de la serie LCG, MBZ, ABZ y FBZ, y su evaluación en la línea celular SK-LU-1.^{15,46}

Como ya se mencionó, estos resultados tienen gran utilidad en la predicción del modo de unión de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo a la β-tubulina. De esta forma, y con base en las características estructurales necesarias para la unión de los derivados al sitio,^{44,47} en un trabajo anterior se realizó un estudio de acoplamiento molecular con seis nuevas moléculas, serie LCG (Figura 2.7),¹⁵ del cual se obtuvo que podrían unirse a la β-tubulina de un modo similar al NZ. Posteriormente, se realizó la evaluación biológica en las líneas celulares de cáncer SK-LU-1, SW620 y MCF7; siendo el derivado LCG1 el más activo de la serie y un *lead* para continuar con su estudio.⁴⁶

No obstante, los compuestos de la serie LCG mostraron problemas de solubilidad acuosa, el mismo problema que la mayoría de los compuestos tipo carbamato suelen exhibir.^{46,48} Pero los resultados obtenidos en este trabajo abren campo al estudio de nuevos derivados del 1*H*-

ilcarbamato de metilo con la finalidad de mantener o aumentar su actividad citotóxica por unión a la β -tubulina, e incrementar su solubilidad acuosa para evitar futuros problemas de biodisponibilidad.

2.5. Isoformas de β -tubulina

Como se ha descrito, los MTAs tienen como blanco principal a la tubulina; de manera más específica, su diana biológica es la subunidad β -tubulina.⁴⁴ Sin embargo, la β -tubulina pertenece a una familia de multigenes que da origen a diez isoformas con un complejo patrón de expresión.^{49,50} Las isoformas de β -tubulina consisten en proteínas de 434–451 aminoácidos con un porcentaje de homología del 73–99% en alineamientos por pares.⁵⁰

Actualmente, ha sido reportado el patrón de expresión de las isoformas de β -tubulina en tejidos sanos (Tabla 2.1) y en diferentes tipos de cáncer (Tabla 2.2).⁴⁹ En este estudio se destacó el cambio en el patrón de expresión de las isoformas entre ambas condiciones y el impacto de este fenómeno para el desarrollo de fármacos con mayor afinidad por una en particular.^{44,49}

Tabla 2.1. Isoformas de β tubulina y su distribución en tejidos normales de un adulto⁴⁹

Nombre	Isoforma de β -tubulina	Gen	Distribución normal
HsBT1	β I	<i>TUBB</i>	Todo, excepto cerebro y testículos
HsBT2a	β IIa	<i>TUBB2A</i>	Cerebro, riñón, músculo, mama, páncreas, hígado, intestino delgado, colon, amígdala y próstata
HsBT2b	β IIb	<i>TUBB2B</i>	Cerebro e intestino delgado
HsBT3	β III	<i>TUBB3</i>	Cerebro
HsBT4a	β IVa	<i>TUBB4/TUBBB4A</i>	Cerebro, bazo y testículos
HsBT4b	β IVb	<i>TUBB2C/TUBB4B</i>	Todo
HsBT5	β V	<i>TUBB6</i>	Pulmón, mama, intestino delgado y próstata
HsBT6	β VI	<i>TUBB1</i>	Médula ósea y células sanguíneas
HsBT7	β VII	<i>TUBB7P</i>	Pseudogen
HsBT8	β VIII	<i>TUBB8</i>	Desconocido

Tabla 2.2. Cambios en la distribución de isoformas de β tubulina en varios tipos de cáncer⁴⁹

Tipo de cáncer	HsBT1	HsBT2a	HsBT3	HsBT4b	HsBT5
Colon	↑	↓	↓	↓	↓
Ovario	≈	↑	↑	↓	↓
Riñón	↑	↓	≈	↓	↑
Próstata	↓	↑	≈	↑	↓
Mama	↑	↓	↑	≈	↓
Pulmón	↑	↑	↑	↓	↓

Nota: ↑ o ↓ indican un incremento o decremento, respectivamente, en la expresión de mRNA de la isoforma de tubulina en muestras de tejidos tumorales con respecto a tejidos sanos y ≈ indica que no hay cambio en la expresión.

En este punto, las dos isoformas con mayor interés en el diseño de nuevos anticancerígenos son HsBT1 y HsBT3 debido a su sobreexpresión en cáncer de colon, riñón, ovario, mama y pulmón.⁵¹ Adicionalmente, la isoforma HsBT3 se ha asociado a tipos de cáncer más agresivos y resistencia a fármacos como taxanos y alcaloides de la vinca.^{10,52–57}

Por otro lado, la HsBT6 es otra isoforma de gran interés ya que no se modifica su patrón de expresión en cáncer, mientras que normalmente se expresa en médula ósea y células sanguíneas;⁴⁹ además, uno de los efectos adversos de MTAs se debe a su acción inespecífica sobre este tipo de células por tener una alta tasa de división en condiciones normales.^{19,30} Por tanto, se podría reducir la hematotoxicidad de un tratamiento evitando que HsBT6 sea blanco inespecífico de los MTAs.^{44,49,58,59}

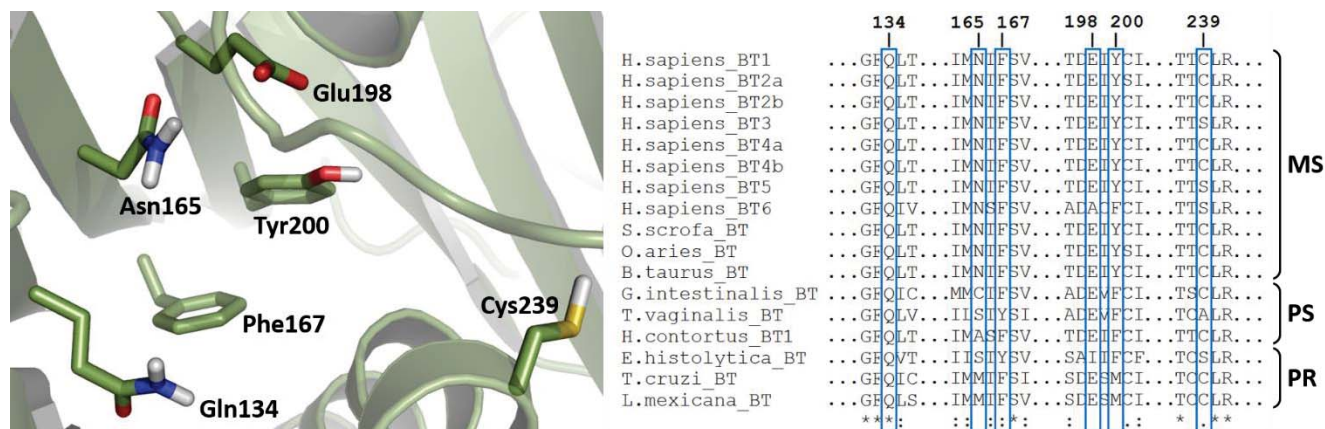


Figura 2.8. Representación y comparación de los aminoácidos que componen al sitio de unión propuesto de los carbamatos bencimidazólicos en las ocho isoformas de β -tubulina de humano y mamíferos (MS), además de parásitos susceptibles (PS) y resistentes (PR) al tratamiento con dichos compuestos.¹⁵

Como ya se mencionó, las isoformas de β -tubulina tienen un alto porcentaje de identidad. Sin embargo, si las diferencias entre los aminoácidos se encuentran en el sitio de unión de los MTAs, se podrían diseñar moléculas que sean más específicas por una isoforma tomando en cuenta los residuos diferentes en cada sitio de unión. No obstante, los sitios de unión para los estabilizadores de la polimerización (taxol, laulimalida y epotilona A) y los desestabilizadores (vinblastina y rizoxina, excepto NZ y colchicina) no presentan diferencias esenciales para el diseño de fármacos con mayor especificidad sobre las isoformas HsBT1 y HsBT3 y, al mismo tiempo, evitar afinidad por la unión con HsBT6.^{15,44}

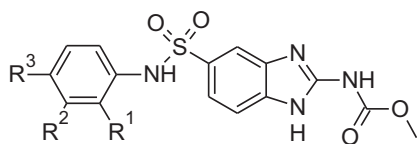
Nuevamente, destacan los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, como el NZ, por la diferencia en el aminoácido 198 de su sitio de unión (Figura 2.8), clave para la estabilización en el sitio en HsBT1 y HsBT3, pero no en HsBT6; y con lo cual se podrían alcanzar dicho objetivo.^{15,44}

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial y, a pesar de las numerosas investigaciones en el tema, aún se requieren más alternativas para su tratamiento. Asimismo, es necesario que las terapias sean dirigidas con la finalidad de reducir su toxicidad.

Dentro de las terapias dirigidas, uno de los blancos ampliamente estudiados son los microtúbulos y se han reportado una gran diversidad de moléculas que pueden interactuar con ellos. Entre estos compuestos, destacan los derivados de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo ya que diversos derivados de este tipo han mostrado actividad antiproliferativa. Sin embargo, la mayoría de ellos presentan baja solubilidad acuosa.

Partiendo de los resultados obtenidos con la serie LCG, se propusieron nuevas moléculas con características estructurales que podrían favorecer su solubilidad acuosa y potencia antiproliferativa. La elección del sustituyente en la posición 5(6) del núcleo de bencimidazol se discutirá posteriormente.



	R ¹	R ²	R ³
PCZ1	H	H	H
PCZ2	OCH ₃	H	H
PCZ3	H	OCH ₃	H
PCZ4	H	H	OCH ₃
PCZ5	H	H	F
PCZ6	H	H	Cl

4. HIPÓTESIS

La serie de nuevos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, con un grupo sulfonamido en 5(6), presentarán actividad antiproliferativa en diferentes tipos de líneas celulares de cáncer debido a su unión con la β -tubulina e interferencia en la polimerización de los microtúbulos.

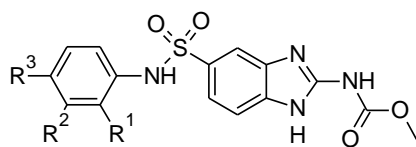
5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar los nuevos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, evaluar su potencial antiproliferativo *in vitro* en líneas celulares de cáncer de pulmón, colon y mama; y analizar su efecto sobre la polimerización de la β -tubulina.

5.2. Objetivos particulares

- Síntesis y caracterización de la serie de compuestos PCZ1-PCZ6.



	R ¹	R ²	R ³
PCZ1	H	H	H
PCZ2	OCH ₃	H	H
PCZ3	H	OCH ₃	H
PCZ4	H	H	OCH ₃
PCZ5	H	H	F
PCZ6	H	H	Cl

- Evaluar la actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer: SK-LU-1 (adenocarcinoma de pulmón), SW620 (adenocarcinoma de colon) y MCF7 (adenocarcinoma de mama).
- Estudiar la inhibición de la polimerización de la tubulina mediante dos técnicas: con Kit de polimerización de la tubulina (Cytoskeleton, Cat #BK004P); y análisis de cambios en la cantidad de tubulina polimerizada y soluble a nivel celular.
- Analizar el efecto inducido por los derivados bencimidazólicos en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1, por medio de inmunofluorescencia.
- Determinar si los derivados promueven arresto del ciclo celular, analizando la presencia de la ciclina B a nivel celular.

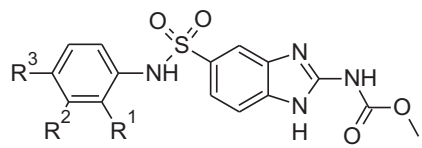
6. METODOLOGÍA

En este apartado se muestran los métodos experimentales de forma breve; sin embargo, los detalles se describen en los anexos.

6.1. Derivados de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

Como primera parte se seleccionaron seis carbamatos bencimidazólicos para su síntesis, los cuales se muestran en la Tabla 6.1. Asimismo, los derivados bencimidazólicos mostrados en la Tabla I.1 del anexo I se emplearon como referencias farmacológicas. Posteriormente, se empleó el servidor FAF-Drugs4⁶⁰ para calcular los parámetros: peso molecular (MW), donadores de puentes de hidrógeno (HBD), aceptores de puentes de hidrógeno (HBA), enlaces rotables (RB), área polar superficial topológica (tPSA) y logaritmo del coeficiente de partición (LogP). Estos parámetros fueron empleados para predecir las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET).

Tabla 6.1. Serie de nuevos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (serie PCZ)



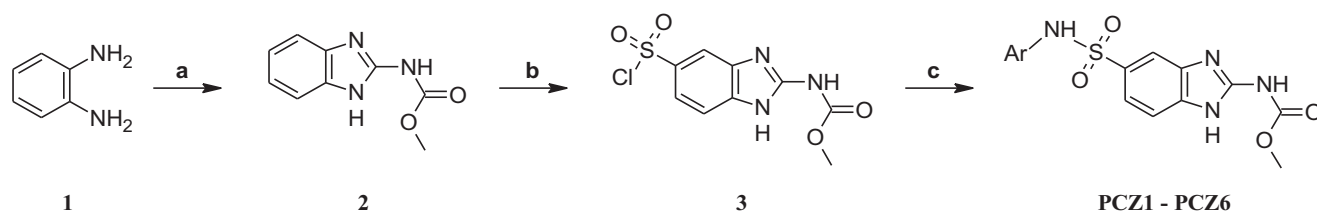
	R ¹	R ²	R ³
PCZ1	H	H	H
PCZ2	OCH ₃	H	H
PCZ3	H	OCH ₃	H
PCZ4	H	H	OCH ₃
PCZ5	H	H	F
PCZ6	H	H	Cl

6.2. Síntesis química

6.2.1. Síntesis de los carbamatos bencimidazólicos PCZ1 – PCZ6

Para la síntesis de los compuestos diseñados se realizó la serie de reacciones indicadas en el Esquema 6.1. Como primer paso se realizó una ciclocondensación de la *o*-fenilendiamina (**1**) con 1.5 eq *N,N'*-dicarboximetoxi-*S*-metilisotiurea en H₂O/MeOH/AcOH. La mezcla se calentó a 60 °C hasta agotarse la materia prima en aproximadamente 5 h. El producto obtenido se separó por filtración al vacío y se realizaron dos lavados con agua y MeOH, respectivamente.

Como siguiente paso, se formó el 5-clorosulfonil-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**3**) a partir del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**2**), al cual se adicionaron gota a gota 3 eq de ClSO₃H, manteniendo una temperatura aproximada de 0 °C. A continuación, se calentó a 60 °C durante 2 h; transcurrido este periodo de calentamiento, se dejó a temperatura ambiente para continuar con la siguiente reacción.



Esquema 6.1. Ruta sintética para la obtención de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo: (a) 1.5 eq *N, N'*-dicarboximetoxi-*S*-metilisotiurea, H₂O/MeOH/AcOH, 60 °C, 5 h; (b) 3 eq ClSO₃H, 60 °C, 2 h; (c) 3 eq ArNH₂ (anilina adecuada), Et₃N, 65 °C, 4 h.

Finalmente, a la mezcla de reacción obtenida (intermediario **3**), se le adicionaron 7 mL trietilamina (Et₃N) y 3 eq de la anilina adecuada para sustituir el cloro y llevar a la formación de los productos finales (PCZ1-PCZ6). Se calentó a 70 °C durante 4 h y transcurrido este tiempo, se adicionó agua y MeOH fríos manteniendo agitación constante. El precipitado formado se lavó con MeOH frío y se caracterizó espectroscópica y espectrométricamente.

6.3. Análisis de la actividad biológica *in vitro*

6.3.1. Evaluación de la viabilidad celular

Se determinó la actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos de la serie PCZ y los controles NZ y cisplatino, en las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1, adenocarcinoma colorectal SW620 y adenocarcinoma mamario MCF7 mediante un ensayo colorimétrico de MTT.

Para ello, se sembraron 4,000 células/pozo en placas de 96 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 0.25 µg/mL de antimicótico Fungizone®. Transcurridas 24 h, se administraron los compuestos en

un esquema de tratamiento experimental de 5 a 50 μM , se dejó en incubación a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO_2 , durante 72 h. Al concluir este periodo, se adicionaron 20 μL de MTT (2.5 mg/mL) por pozo y se colocó nuevamente en incubación durante 1.5 h. Finalmente, el medio de cultivo fue removido y los cristales de formazán se solubilizaron con 200 μL de DMSO por pozo. Empleando un lector de placas Epoch® se determinó la absorbancia a 540 nm. Con los datos obtenidos se calculó la viabilidad comparada con el control con el vehículo y se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}).

Las evaluaciones se realizaron por triplicado de manera independiente y el análisis de los datos, regresión no lineal, se realizó empleando el software OriginPro®. Adicionalmente, se determinó la actividad citotóxica en un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica sanas (CMSP) y en macrófagos THP-1 mediante el mismo método.

6.3.2. Ensayo de inhibición de la polimerización de la tubulina

Se realizó un ensayo *in vitro* para monitorizar la polimerización de la tubulina dependiente del tiempo empleando un kit de polimerización de la tubulina (Cytoskeleton, Cat # BK004P) basado en la dispersión de la luz directamente proporcional a la concentración de polímero de microtúbulos. Para ello se siguieron las recomendaciones del proveedor. Se determinó la interferencia en la polimerización del compuesto PCZ1 (50 μM) y los controles NZ (10 μM) y taxol (10 μM).

Quedando una concentración final en el pozo de reacción de: 3 mg/mL de tubulina en 80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10.2% glicerol, en presencia o ausencia del compuesto estudiado a la concentración antes indicada. La polimerización de la tubulina se registró en un lector de placas Epoch™ 2 a 340 nm, 37 °C, durante 60 min, realizando lecturas en intervalos de un minuto.

Con los datos obtenidos, se realizó un gráfico de la densidad óptica en función del tiempo (min) y se calculó la velocidad máxima de polimerización (V_{max}).

6.3.3. Análisis por *Western blot* de la tubulina soluble y polimerizada

En este ensayo de *Western blot* o inmunoelectrotransferencia se realizó una comparación de la cantidad de tubulina soluble y polimerizada en células SK-LU-1 tratadas con los compuestos PCZ1 (46.9 μM), PCZ4 (11.7 μM) y NZ (0.08 μM), también se decidió evaluar al derivado LCG1 (0.08 μM) por ser el compuesto más activo de la serie LCG; para ello se empleó la metodología reportada previamente para la extracción de ambas fracciones,⁶¹ misma que se describe a continuación.

Primero, se sembraron 20×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB. Transcurridas 24 h, se administraron los compuestos a su respectiva CI_{50} y se colocaron en incubación a 37 °C, una atmósfera humidificada con 5% CO_2 , durante 24 h. Al concluir este periodo, se realizaron tres lavados con PBS y se procedió a la extracción de ambas fracciones.

Para obtener las fracciones solubles, las células fueron permeabilizadas con 1000 μL de amortiguador de lisis [80 mM Pipes-KOH pH 6.8, 1 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0.2% Tritón X-100, 10% glicerol, y las proteasas, 0.1% TPCK (Sigma-Aldrich®) y 0.1% TLCK (Sigma-Aldrich®)] y se incubaron durante 3 min a 30 °C. Al finalizar, se centrifugó a 800 rpm por 5 min y el sobrenadante fue removido suavemente, esta fracción corresponde a la de tubulina soluble. Al remanente celular se le adicionaron 1000 μL de amortiguador de Laemmli [180 mM Tris-Cl pH 6.8, 6% SDS, 15% glicerol y 7.5% β -mercaptoetanol], se colocó en incubación a 95 °C durante 3 min y se centrifugó a 800 rpm por 5 min. Nuevamente se recuperó el sobrenadante, en este caso corresponde a la fracción de tubulina insoluble. Posteriormente, las fracciones de tubulina soluble y polimerizada se cuantificaron con el kit de cuantificación de proteínas 2D Quant (GE Healthcare®).

Se prepararon geles SDS-PAGE para separar las proteínas (30 μg de proteína de cada fracción/pozo) y transferirlas a una membrana de PVDF, ver Anexo III.1.1. A continuación, las membranas se bloquearon con albúmina al 3% durante aproximadamente 12 h a 4°C con agitación constante. Al término, se realizó la detección la β -tubulina en las fracciones soluble y polimerizada empleando el anticuerpo monoclonal primario anti β -tubulina T0198 Aldrich® (1:500), se incubó durante 2 h a 37 °C. Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min cada uno.

Finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP a una dilución 1:1000, durante 2 h a 37 °C, y se realizaron tres lavados de la misma forma.

Para el revelado, las membranas se sumergieron en 6 mL de medio cromogénico (ver Anexo III.1.12) y se mantuvo en agitación hasta que se observaron las bandas. Por último, se paró la reacción con agua destilada y las membranas se colocaron a secar a temperatura ambiente.

La cuantificación de la intensidad de las bandas por densitometría (píxeles) se llevó a cabo con el programa QuantityOne V 4.6 (Bio-Rad®). Los resultados se expresaron en porcentaje, tomando como 100% a la banda correspondiente al control sin tratamiento. Este experimento se realizó por duplicado.

6.3.4. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron células SK-LU-1 sobre cubreobjetos de vidrio y se incubaron durante 24 h, en presencia o ausencia de los compuestos PCZ1 (46.9 μ M), PCZ4 (11.7 μ M), NZ (0.08 μ M) y LCG1 (0.08 μ M) a su Cl_{50} respectiva. Transcurrido el periodo, las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4, 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de permeabilización empleando una solución de Triton X-100 al 0.5% y SDS al 0.5% en PBS, durante 10 min. Posterior a la permeabilización, las células fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) al 3% por 1 h. Entre cada uno de estos pasos, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS. En el siguiente, cada muestra se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti β -tubulina T0198 (1:500) durante 1 h y se realizaron cinco lavados al finalizar el tiempo de incubación. Por último, cada muestra se incubó simultáneamente con el anticuerpo secundario anti-mouse acoplado a fluoresceína (1:500) y DAPI (1:600), 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron cinco lavados con PBS y se montaron sobre portaobjetos con 10 μ L de Vectashield®. Para la visualización y captura de las imágenes se empleó un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX41).

6.3.5. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta

Este experimento se realizó bajo las mismas condiciones que el ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando la β -tubulina (ver apartado 6.3.4), modificando únicamente el anticuerpo primario. El anticuerpo monoclonal primario utilizado fue anti ciclina B Millipore® (1:500).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo

En la actualidad hay un gran número de reportes de derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo con actividad citotóxica;^{34–41} sin embargo, la mayoría de estos compuestos presenta una pobre solubilidad acuosa.⁴⁸ Siendo este factor uno de los principales problemas que dificultan la determinación de la actividad biológica de los derivados y se refleja, finalmente, en problemas de biodisponibilidad. Por ello, es un problema clave a resolver sin disminuir su efecto biológico.

De acuerdo con reportes de actividad de los carbamatos bencimidazólicos en diversos organismos, se conoce qué sustituciones son importantes para mantener la actividad de este tipo de compuestos.^{44,47} En la Figura 7.1. se muestran las sustituciones de mayor relevancia que contribuyen en su actividad biológica.

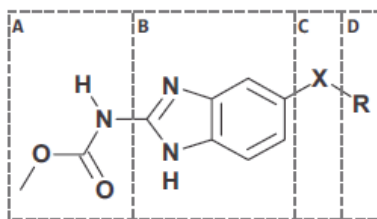


Figura 7.1. Zonas farmacofóricas del núcleo bencimidazol relevantes en la actividad antitumoral de los derivados.⁴⁴

Primero, en el recuadro de la Figura 7.1, en la zona denotada con A se localiza el sustituyente carbamato de metilo en posición 2 del núcleo de bencimidazol. En esta región se destacan las interacciones entre el nitrógeno y el grupo metoxilo del carbamato con los residuos Glu198 y Asn165 de la β -tubulina (Figura 2.6), respectivamente; siendo más relevante la primera interacción.⁴⁴ Mientras que en la zona B, es importante conservar el núcleo de bencimidazol ya que puede interactuar tanto con el Glu198 como con la cadena principal de la Val236 debido al tautomerismo que sufre esta estructura.^{44,45}

Por otro lado, las regiones disponibles para realizar modificaciones a la estructura con la finalidad de mejorar las propiedades ADMET o la actividad biológica, son la C y D, que se

localizan en la posición 5(6) del núcleo de bencimidazol. En la zona C es necesario mantener un grupo aceptor de puentes de hidrógeno para interactuar con el aminoácido en posición 236, que puede ser Cys o Ser dependiendo la isoforma de β -tubulina; o de manera indirecta por una interacción con una molécula de agua estructural en esta zona.⁴⁵ Por último, en la zona D, los grupos aromáticos favorecen la interacción con los aminoácidos del sitio de unión;⁴⁴ además, dada su cercanía al sitio de la colchicina, podría ser óptimo emplear grupos metoxilos para incrementar la interacción con él mismo.

De manera general, estas regiones pueden integrarse en tres partes principales para su simplificación: 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo (núcleo principal), un sustituyente aromático y un conector entre ellos (ver Figura 7.2). Por otra parte, considerando que previamente en el grupo de investigación se estudiaron derivados (Figura 7.2.A) con un oxígeno como conector y grupos naftilo o quinolina en el sustituyente aromático y que presentaron alta actividad citotóxica,^{15,46} pero con problemas de solubilidad, se procedió a explorar otro conector y sustituyentes aromáticos.

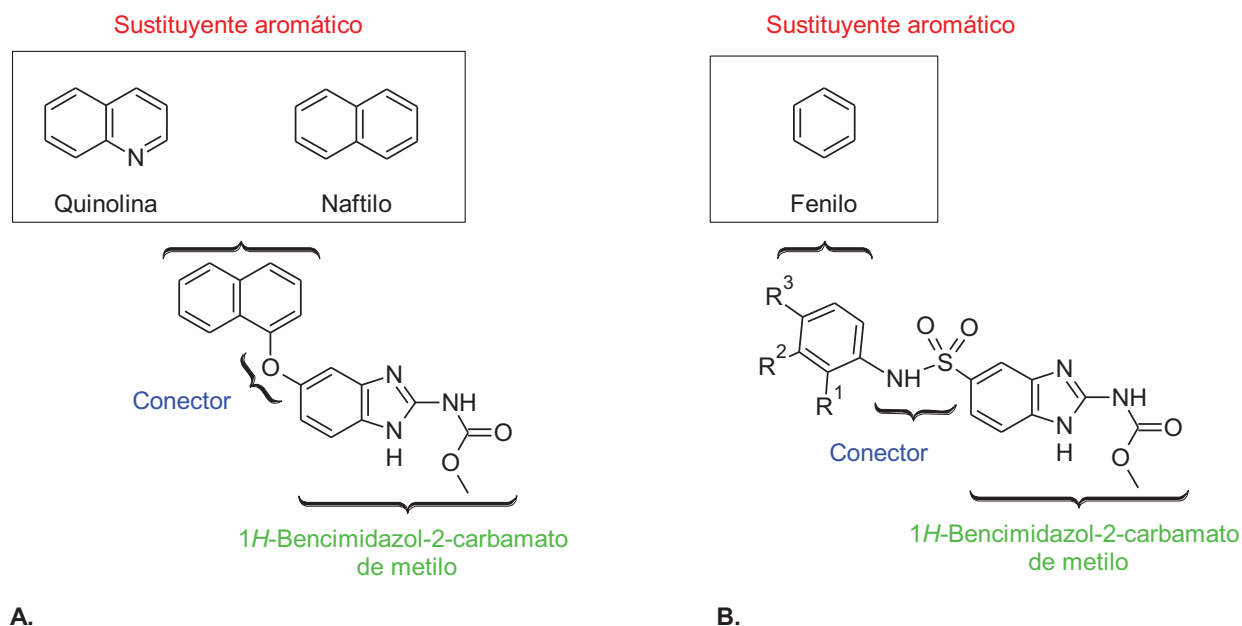


Figura 7.2. Partes de la estructura de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo: (A) Compuestos de la serie LCG, (B) Compuestos de la serie PCZ.

Partiendo de lo expuesto arriba, se propuso una nueva serie de derivados (ver Figura 7.2.B, Tabla 6.1) donde el conector empleado fuera un grupo sulfonamida para incrementar la solubilidad de las moléculas, y al mismo tiempo reducir la lipofilicidad cambiando el biciclo por un anillo de fenilo.

Adicionalmente, el grupo sulfonamida se eligió porque se encuentra presente en una gran cantidad de compuestos con diversos usos farmacológicos, tales como actividad antibacteriana, inhibidores de la anhidrasa carbónica, diuréticos, hipoglucemiante y con actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*.⁶² Asimismo, se tienen reportes de sulfonamidas que interfieren con la mitosis a través de su unión al sitio de la colchicina en la β -tubulina.^{62,63}

En cuanto al grupo fenilo, al ser de menor tamaño que un biciclo, la lipofilicidad en esta región se disminuye y al mismo tiempo pueden estudiarse diversas sustituciones en el anillo; por ejemplo, los grupos metóxilos, que como ya se mencionó antes, podrían favorecer la actividad de los compuestos.

Tabla 7.1. Propiedades moleculares de los derivados bencimidazólicos

Compuesto	MW	LogP	tPSA	HBD	HBA	RB	GSK 4/400	Pfizer 3/75	Resultado
ABZ	265.33	3.07	95.54	2	5	5	Bueno	Precaución	Aceptable
ABZSO(+)	281.331	1.35	106.52	2	6	5	Bueno	Bueno	Aceptable
ABZSO(-)	281.331	1.35	106.52	2	6	5	Bueno	Bueno	Aceptable
FBZ	299.348	3.56	95.54	2	5	4	Bueno	Precaución	Aceptable
FBZSO(+)	315.347	2.18	106.52	2	6	4	Bueno	Bueno	Aceptable
FBZSO(-)	315.347	2.18	106.52	2	6	4	Bueno	Bueno	Aceptable
MBZ	295.29	2.83	87.31	2	6	4	Bueno	Bueno	Aceptable
NZ	301.32	2.84	115.55	2	6	4	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ1	346.36	2.01	124.79	3	8	4	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ2	376.39	1.98	137.59	3	9	5	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ3	376.39	1.98	134.02	3	9	5	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ4	376.39	1.98	134.02	3	9	5	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ5	364.35	2.11	124.79	3	8	4	Bueno	Bueno	Aceptable
PCZ6	380.81	2.64	124.79	3	8	4	Bueno	Bueno	Aceptable

Como primer punto, se descartó que las moléculas elegidas para su síntesis presentaran propiedades fisicoquímicas que afectaran sus propiedades ADMET. Para ello, en cuanto a la biodisponibilidad oral, se determinó que los derivados bencimidazólicos cumplieran con los criterios de aceptación de las reglas de Lipinski ($MW \leq 500$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$ y $\text{LogP} \leq 5$)⁶⁴, Egan ($0 \leq \text{tPSA} \leq 132$, $-1 \leq \text{LogP} \leq 6$)⁶⁵ y Veber ($RB \leq 10$, $\text{tPSA} \leq 140$)⁶⁶; mientras que para la predicción de la toxicidad, se emplearon las reglas de GSK 4/400 ($\text{LogP} > 4$, $MW > 400$)⁶⁷ y Pfizer 3/75 ($\text{LogP} > 3$, $\text{tPSA} < 75$)⁶⁸.

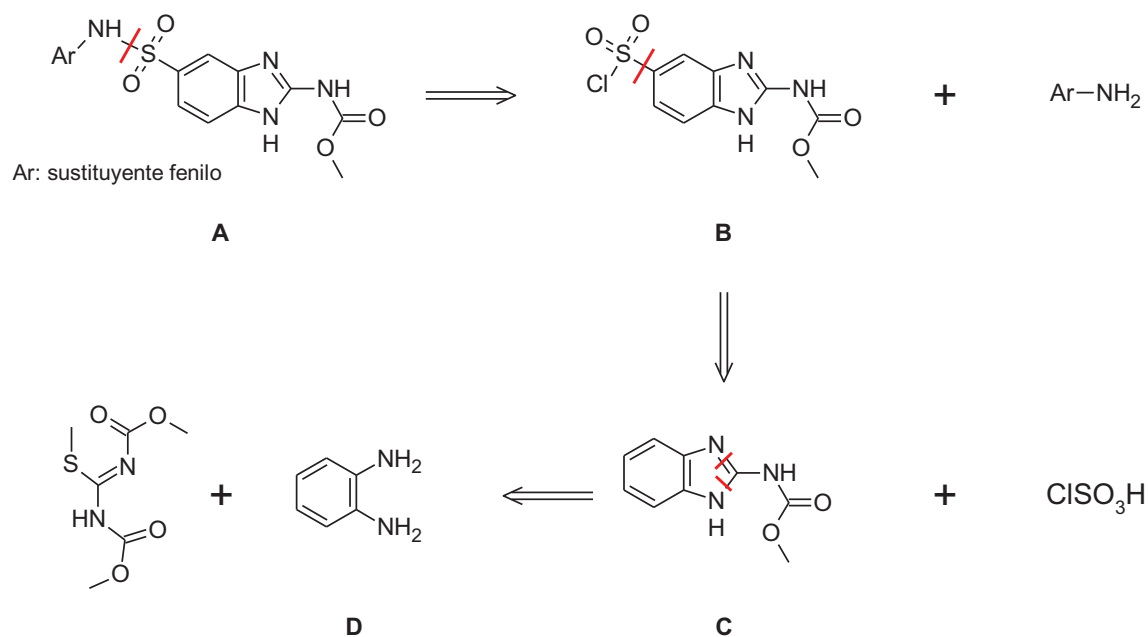
En la Tabla 7.1 se muestran los valores determinados con ayuda del servidor FAF-Drugs4⁶⁰ de las propiedades moleculares MW, HBD, HBA, RB, tPSA y LogP de los compuestos PCZ y los de referencia, fármacos disponibles en el mercado. Como se puede observar, solo existen dos violaciones a la regla de Pfizer y están dadas por los compuestos ABZ y FBZ; sin embargo, de acuerdo con estas reglas, los compuestos de la serie PCZ no presentarían mayores problemas de biodisponibilidad oral y tendrán bajo riesgo de toxicidad. Aunque es preciso confirmar estas predicciones.

7.2. Síntesis química

7.2.1. Análisis retrosintético

Para sintetizar los seis carbamatos bencimidazólicos (Serie PCZ) se realizó el análisis retrosintético que se muestra en el Esquema 7.1.

Se planteó obtener las sulfonamidas (**A**) a partir de la sustitución del cloro por la anilina adecuada en el intermediario [5-(clorosulfonil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**B**). Al intermediario **B** se llegaría por una reacción de Sustitución Electrofilica Aromática (S_{EAr}) a partir de los intermediarios: 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**C**) y ácido clorosulfónico ($ClSO_3H$). Por último, para obtener el 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**C**) se realizaría por una ciclocondensación, siendo los precursores: *o*-fenilendiamina (**D**) y *N,N*-dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiurea.



Esquema 7.1. Análisis retrosintético para la obtención de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo.

7.2.2. Síntesis de los carbamatos bencimidazólicos PCZ1 – PCZ6

Como se mostró en el Esquema 6.1, la ciclocondensación es el primer paso de reacción y es común para la síntesis de los seis derivados. Por otro lado, la S_EAr, el segundo paso de la ruta sintética se realizó empleando la misma metodología, pero no se aisló el producto de esta reacción y se procedió inmediatamente con la siguiente. En la Tabla 7.2 se presentan los rendimientos de las reacciones para la obtención de los compuestos **PCZ1-PCZ6**.

Tabla 7.2. Rendimientos de las reacciones involucradas en la síntesis de los compuestos PCZ

Compuesto	Rendimiento (%)			
	Ciclocondensación	S _E Ar	Sustitución	Global
PCZ1	98.0	ND	46.1	45.2
PCZ2	98.0	ND	41.8	41.0
PCZ3	98.0	ND	37.5	36.8
PCZ4	98.0	ND	43.1	42.2
PCZ5	98.0	ND	32.7	32.0
PCZ6	98.0	ND	27.0	26.5

ND: No determinado.

A continuación, se presentan las constantes físicas, punto de fusión y factor de retención, de los intermediarios y los productos finales (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Constantes físicas de los intermediarios aislados y productos finales

Compuesto	Punto de fusión (°C)	Factor de retención* (R _f)
2	301.6-302.6	0.22
3	ND	ND
PCZ1	268.4 - 269.2	0.53
PCZ2	264.0 - 264.8	0.59
PCZ3	266.0 - 267.6	0.57
PCZ4	267.3 - 268.3	0.52
PCZ5	276.5 - 275.5	0.54
PCZ6	206.5 - 207.5	0.58

ND: No determinado. *Sistema de elución I CHCl₃:MeOH (95:5) con una gota de NH₄OH.

hidrógeno, los cuales coinciden con los reportados.⁷⁰ Por último, fueron identificadas las señales correspondientes a los átomos de carbono de la molécula en el espectro de RMN ¹³C, incluyendo a los carbonos cuaternarios.

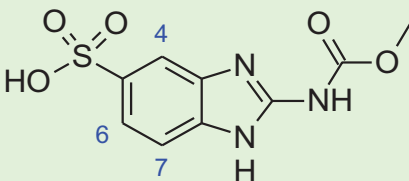
7.2.4. S_EAr: 5-clorosulfonil-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (3)

Previo a establecer las condiciones de reacción, se probaron metodologías reportadas en la literatura;^{71,72} sin embargo, la baja solubilidad de **2** y la inestabilidad de **3** impidieron que se llevara a cabo la formación del producto.

En esta serie de pruebas se obtuvo como producto colateral el ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1*H*-bencimidazol-5-sulfónico (**3a**); dada su alta polaridad, no se desplazó del origen en la ccf empleando el Sistema de elución I. En la Tabla 7.5 se presenta su estructura y se resumen sus constantes espectroscópicas de IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y análisis elemental, así como las asignaciones del compuesto (ver Anexo II.2).

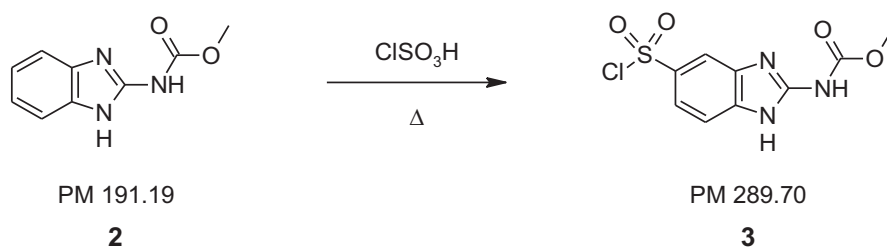
Se identificaron las bandas correspondientes a los principales grupos funcionales de la molécula en el espectro de IR: Ar-NH-R₂, OH, C-H aromático, CH₃, C-H aromático, C=O, C=C aromático, COO-CH₃ y S=O.

Tabla 7.5. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de **3a**

Compuesto	Método analítico y señales
 <p>Ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1<i>H</i>-bencimidazol-5-sulfónico (3a)</p>	<p>Espectro 4, IR (ATR, cm⁻¹): 3470 (Ar-NH-R₂), 3412 (OH), 3149 - 3074 (C-H aromático), 2805 (CH₃), 1867 (C-H aromático), 1740 (C=O), 1594 - 1512 (C=C aromático), 1349 (COO-CH₃), 1300 (S=O), 1170 (S=O).</p> <p>Espectro 5, RMN ¹H (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, δ en ppm): 3.75 (s, 3H, -OCH₃), 7.29 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-7), 7.39 (dd, J = 8.3, 1.6 Hz, 1H, H-6), 7.68 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H-4), 11.66 (s, 2H, -NH).</p> <p>Espectro 6, RMN ¹³C (TMS, DMSO-<i>d</i>₆, δ en ppm): 52.4 (-OCH₃), 111.0 (C-4), 112.6 (C-7), 119.2 (C-6), 141.9 (C-3a, C-7a), 148.3 (C-2), 155.1 (-CO).</p> <p>AE, %Obtenido (%Esperado): C 25.04 (39.85), H 1.54 (3.24), N 9.38 (15.49), S 8.78 (11.82).</p>

En el espectro de RMN ^1H se identificaron las señales de los átomos de hidrógeno con la multiplicidad correspondiente; además se observó que las señales de los hidrógenos de los grupos $-\text{OCH}_3$ y $-\text{NH}$ a 3.75 y 11.66 ppm, respectivamente, tienen un desplazamiento similar que en **2**. En cuanto al espectro de RMN ^{13}C se identificaron los carbonos de la molécula, excepto el carbono cuaternario C-5; las señales correspondientes a $-\text{OCH}_3$, C-2 y $-\text{CO}$ también son similares que en **2**.

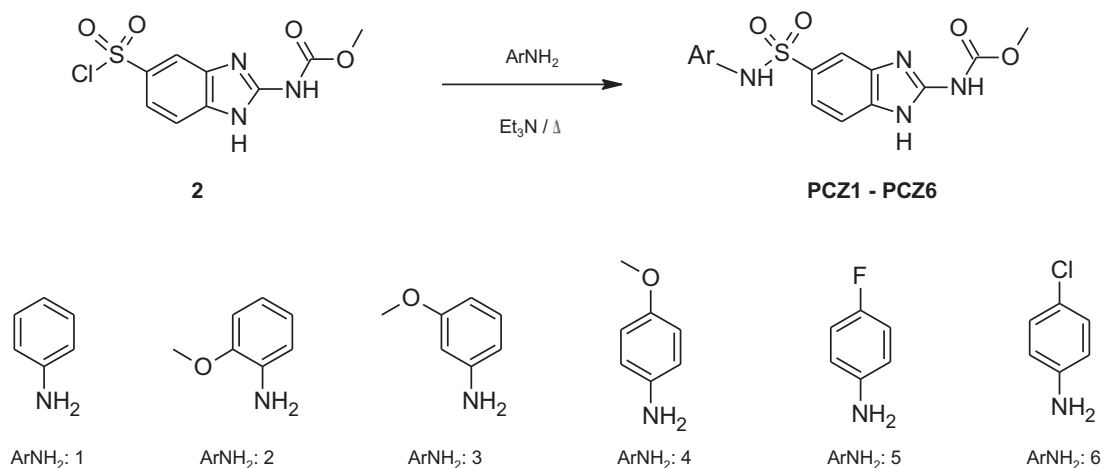
Finalmente, en el análisis elemental de la muestra, los porcentajes obtenidos para cada elemento son diferentes de los esperados debido a que el compuesto contenía algunas impurezas, como se puede observar en los espectros de RMN. Continúa siendo necesario obtención del espectro de masas para completar su caracterización. No obstante, la identificación de **3a** ayudó a constatar la formación del intermediario **3** y su rápida descomposición.



Esquema 7.3. Sustitución Electrofílica Aromática para la obtención del intermediario **3**.

Debido a la inestabilidad de **3**, se procedió a efectuar la reacción de $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$ sin aislar el producto, de manera independiente y previa a la formación del producto final deseado. El ClSO_3H se adicionó a **2** lentamente; durante la adición se controló que la temperatura se mantuviera aproximadamente a $0\text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente la mezcla se calentó a $60\text{ }^\circ\text{C}$. No se requirió de disolvente, aunque al final se obtuvo un producto viscoso que se sometió inmediatamente al siguiente paso.

7.2.5. Síntesis de los productos finales (PCZ1-PCZ6)



Esquema 7.4. Reacción de sustitución para la obtención de los compuestos finales **PCZ1-PCZ6**.

Los compuestos de la serie PCZ se obtuvieron a partir de la sustitución del Cl de **3** por la anilina (ArNH_2) adecuada. Para ello, el producto de la reacción anterior se dejó a temperatura ambiente, se adicionó Et_3N y posteriormente la ArNH_2 (en caso necesario, se solubilizaron previamente en Et_3N). El rendimiento de estas reacciones fue bajo y nuevamente se formó **3a**. El punto de fusión de los compuestos es relativamente alto y el R_f alrededor de 0.5, como se observa en la Tabla 7.3.

La serie de derivados bencimidazólicos fueron caracterizados espectroscópicamente y espectrométricamente. Las constantes espectroscópicas y las asignaciones realizadas se muestran en la Tabla 7.6 y los espectros completos en el Anexo II.2.

En los espectros de IR se identificaron las bandas a 3334-3280, 2849-2837, 1629-1712, 1149-1158 cm^{-1} que corresponden a los Ar-NH-R_2 , CH_3 , C=O y S=O , respectivamente, y además de otras particulares correspondientes al sustituyente en posición 5.

En cuanto a la asignación de las señales en los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , en la Figura 7.3 se presentan las señales registradas con desplazamientos similares; sin embargo, no fue posible identificar algunos átomos de carbono. Asimismo, el desplazamiento en el grupo sustituyente presenta más variaciones por las modificaciones que éstos presentan. En el caso particular del compuesto PCZ6, no fue posible la asignación de todos los átomos de hidrógeno.

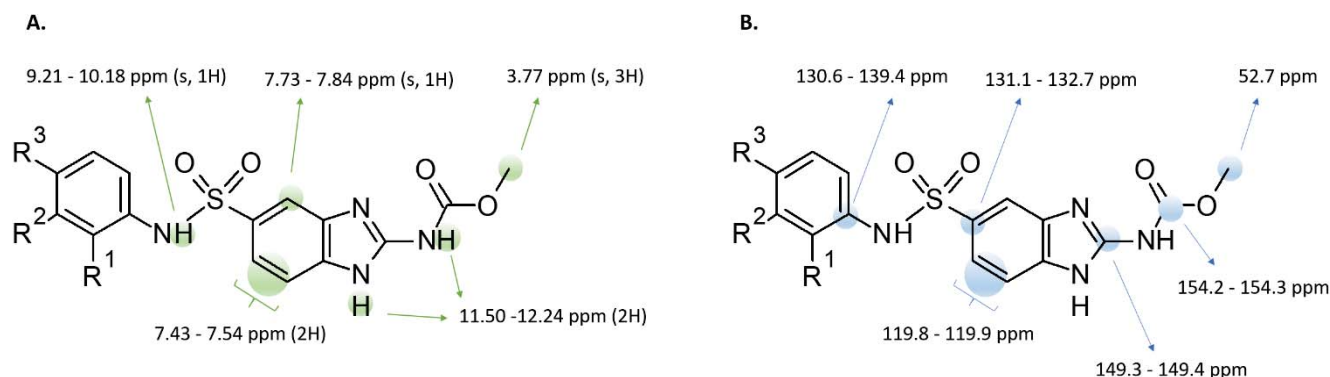
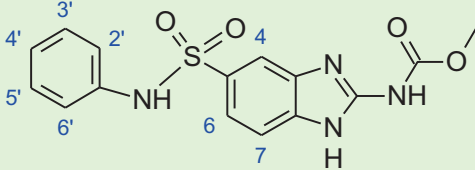
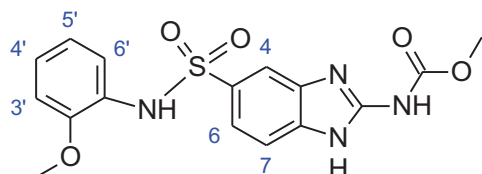


Figura 7.3. Relación de los desplazamientos químicos constantes en las moléculas de la serie **PCZ** en: A. RMN ¹H y B. RMN ¹³C.

Por último, los resultados de espectrometría masas para los compuestos PCZ1-PCZ4 coinciden con los de análisis elemental; además, el ion molecular corresponde al pico base y experimentan la pérdida de la anilina como primera fragmentación. Por otro lado, en el espectro de masas de PCZ5 se obtuvo la masa esperada, aunque es necesario repetir el análisis ya que la diferencia de masa es mayor a 5 ppm; mientras que para PCZ6 los porcentajes de composición obtenidos en análisis elemental se aproximan a los esperados. Para estos dos compuestos es necesario repetir las determinaciones.

Tabla 7.6. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos de la serie **PCZ**

Compuesto	Método analítico y señales
 [5-(fenilsulfamoil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1)	Espectro 7, IR (ATR, cm⁻¹): 3516 - 3263 (Ar-NH-R ₂), 3078 - 2954 (C-H aromático), 2849 (CH ₃), 1731 - 1677 (C-H aromático), 1629 (C=O), 1592 - 1493 (C=C aromático), 1434 - 1384 (COO-CH ₃), 1331 (S=O), 1150 (S=O).
	Espectro 8, RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 3.77 (s, 3H, -OCH ₃), 6.97 (t, J = 7.3 Hz, 1H, H-4'), 7.08 (d, J = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.18 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.45 - 7.51 (m, 2H, H-6, H-7), 7.82 (s, 1H, H-4), 10.12 (s, 1H, -SNH), 11.51 (s, 1H, -NH), 12.20 (s, 1H, -NH).
	Espectro 9, RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 52.7 (-OCH ₃), 119.8 (C-2', C-6', C-6 y C-7), 123.7 (C-4'), 129.1 (C-3', C-5'), 131.7 (C-5), 138.1 (C-1'), 149.4 (C-2), 154.2 (-CO).
	Espectro 10, EM (ESI+, m/z) (%ab): 347 (M+H ⁺ , 100%); 254 (M ⁺ - 93, 2%); 145 ([254 - 109], 26 %). AE, E %o (%e): C 51.37 (52.02), H 2.59 (4.07), N 16.19 (16.18), S 7.23 (9.26).



{5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo
(PCZ2)

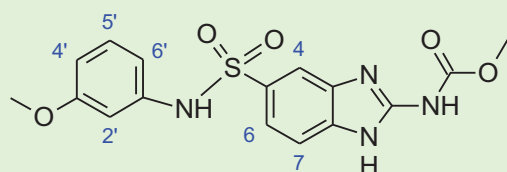
Espectro 15, IR (ATR, cm^{-1}): 3339 - 3277 (Ar-NH-R₂), 3094 - 3036 (C-H aromático), 2960 - 2730 (CH₃), 1909 (C-H aromático), 1712 (C=O), 1584 - 1496 (C=C aromático), 1352 (COO-CH₃), 1326 (S=O), 1150 (S=O).

Espectro 16, RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 3.45 (s, 3H, -OCH₃ en C-2'), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 6.80 - 6.87 (m, 2H, H-3', H-5'), 7.05 (td, J = 8.2, 1.6 Hz, 1H, H-4'), 7.22 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H, H-6'), 7.46 (d, J = 0.8 Hz, 2H, H-6, H-7), 7.77 (s, 1H, H-4), 9.21 (s, 1H, -SNH), 11.52 (s, 1H, -NH), 12.15 (s, 1H, -NH),

Espectro 17, RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 52.7 (-OCH₃), 55.5 (-OCH₃ en C-2'), 111.8 (C-3' o C-5'), 119.9 (C-6 y/o C-7), 120.4 (C-3' o C-5'), 124.1 (C-6'), 126.1 (C-4'), 132.7 (C-5), 149.3 (C-2), 151.9 (C-2'), 154.3 (-CO).

Espectro 18, EM (ESI+, m/z) (%ab): 377 (M+H⁺, 100%); 327 (M⁺- 50, 2%); 192 ([327 - 135], 2 %); 117 ([192 - 75], 12 %).

AE, E %o (%e): C 51.55 (51.06), H 3.28 (4.28), N 15.21 (14.89), S 7.00 (8.52).



{5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo
(PCZ3)

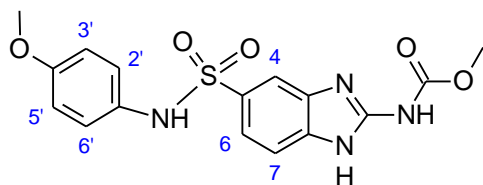
Espectro 23, IR (ATR, cm^{-1}): 3364 - 3249 (Ar-NH-R₂), 3095 - 3011 (C-H aromático), 2960 - 2837 (CH₃), 1768 (C-H aromático), 1698 (C=O), 1594 - 1495 (C=C aromático), 1432 - 1377 (COO-CH₃), 1320 (S=O), 1158 (S=O).

Espectro 24, RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 3.63 (s, 3H, -OCH₃ en C-3'), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 6.53 (ddd, J = 8.3, 2.4, 0.8 Hz, 1H, H-4'), 6.66 (ddd, J = 3.3, 2.8, 1.4 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.08 (t, J = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 7.47 - 7.54 (m, 2H, H-6, H-7), 7.84 (s, 1H, H-4), 10.18 (s, 1H, -SNH), 11.57 (s, 1H, -NH), 12.24 (s, 1H, -NH).

Espectro 25, RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 52.7 (-OCH₃), 55.0 (-OCH₃ en C-3'), 105.3 (C-2'), 108.6 (C-4'), 111.6 (C-6'), 119.9 (C-6 y/o C-7), 129.9 (C-5'), 131.6 (C-5), 139.4 (C-1'), 149.4 (C-2), 154.2 (-CO), 159.6 (C-3').

Espectro 26, EM (ESI+, m/z) (%ab): 377 (M+H⁺, 100%); 254 (M⁺- 123, 6%); 117 ([254 - 137], 2 %).

AE, E %o (%e): C 50.61 (51.06), H 3.50 (4.28), N 15.11 (14.89), S 7.47 (8.52).



{5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo
(PCZ4)

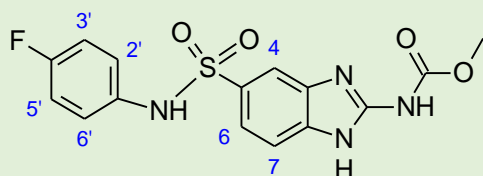
Espectro 31, IR (ATR, cm^{-1}): 3334 - 3259 (Ar-NH-R₂), 3117 - 2988 (C-H aromático), 2958 - 2730 (CH₃), 1850 (C-H aromático), 1697 (C=O), 1592 - 1463 (C=C aromático), 1427 - 1377 (COO-CH₃), 1328 (S=O), 1150 (S=O).

Espectro 32, RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 3.64 (s, 3H, -OCH₃ en C-4'), 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 6.76 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.96 (d, J = 8.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 1H, H-6), 7.47 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.73 (s, 1H, H-4), 9.74 (s, 1H, -SNH), 11.50 (s, 1H, -NH), 12.19 (s, 1H, -NH).

Espectro 33, RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 52.7 (-OCH₃), 55.1 (-OCH₃ en C-4'), 114.2 (C-3', C-5'), 119.9 (C-6 y/o C-7), 123.2 (C-2', C-6'), 130.6 (C-1'), 131.7 (C-5), 149.4 (C-2), 154.2 (-CO), 156.3 (C-4').

Espectro 34, EM (ESI+, m/z) (%ab): 377 (M+H⁺, 100%); 327 (M⁺ - 50, 2%); 193 ([327 - 134], 2 %); 147 ([193 - 46], 18 %).

AE, E %o (%e): C 51.57(51.06), H 2.99 (4.28), N 15.22 (14.89), S 6.99 (8.52).



{5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo
(PCZ5)

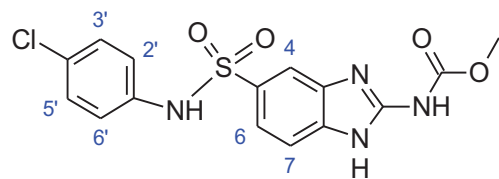
Espectro 39, IR (ATR, cm^{-1}): 3553 - 3280 (Ar-NH-R₂), 3118 - 3016 (C-H aromático), 2959 (CH₃), 1700 (C=O), 1593 - 1506 (C=C aromático), 1433 - 1381 (COO-CH₃), 1330 (S=O), 1149 (S=O).

Espectro 40, RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 3.77 (s, 3H, -OCH₃), 7.03 - 7.07 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.44 (dd, J = 8.4, 1.7 Hz, 1H, H-6), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-7), 7.76 (s, 1H, H-4), 10.09 (s, 1H, -SNH), 11.53 (s, 1H, -NH), 12.23 (s, 1H, -NH).

Espectro 41, RMN ¹³C (TMS, DMSO-d₆, δ en ppm): 52.7 (-OCH₃), 115.7 (C-3' o C-5'), 115.9 (C-3' o C-5'), 119.8 (C-7), 122.5 (C-2' o C-6'), 122.6 (C-2' o C-6'), 131.1 (C-5), 134.3 (C-1'), 149.3 (C-2), 154.2 (-CO), 160.1 (C-4').

Espectro 42, EM (ESI+, m/z) (%ab): 365 (M+H⁺, 100%); 283 (M⁺ - 82, 2%); 117 ([283 - 166], 28 %).

Nota: Diferencia de masa >5 ppm



{5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-
bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
(**PCZ6**)

Espectro 47, IR (ATR, cm^{-1}): 3366 - 3158 (Ar-NH-R₂), 3059 (C-H aromático), 2952 (CH₃), 2611 (Ar-NH-R₂), 1902 (C-H aromático), 1637 (C=O), 1593- 1490 (C=C aromático), 1458 - 1396 (COO-CH₃), 1307 (S=O), 1142 (S=O).

Espectro 48, RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 3.78 (s, 3H, -OCH₃), 6.91 (d, J = 8.6 Hz), 7.09 (d, J = 8.8 Hz), 7.25 (d, J = 8.7 Hz), 7.51 (s, 2H, H-6, H-7), 7.82 (s, 1H, H-4), 10.31 (s, 1H, -SNH).

Espectro 49, RMN ¹³C (TMS, DMSO-*d*₆, δ en ppm): 52.8 (-OCH₃), 112.9 (C-4), 114.1 (C-6 o C-7), 119.4, 120.1 (C-6 o C-7), 121.4, 124.7, 127.8, 129.0, 131.7 (C-5), 137.0, 140.4, 146.7, 149.1 (C-2), 154.0 (-CO).

AE, E %o (%e): C 43.37 (47.31), H 1.56 (3.44), N 10.57 (14.71), S 8.79 (8.42).

La asignación de los átomos de hidrógeno y carbono en los espectros de RMN se realizó con los datos obtenidos en RMN ¹H, RMN ¹³C y los siguientes experimentos: COSY (Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) y NOESY (Nuclear Overhauser Efecto Spectroscopy). A continuación, se describirá el proceso utilizando como ejemplo al compuesto PCZ4 (ver en Anexo II.2 los espectros completos).

Los primeros dos átomos de hidrógeno identificados (11.50 – 12.19 ppm) fueron los correspondientes a las señales de los grupos -NH del núcleo de bencimidazol y del carbamato, cuyo desplazamiento es similar para el intermediario **2**. Posteriormente se asignó la señal del hidrógeno del grupo sulfonamida en 9.74 ppm, la cual es un singulete que no se localiza en la región de los hidrógenos aromáticos.

A continuación, se determinaron las correlaciones de los acoplamientos de los hidrógenos vecinos (fuera de la diagonal) en el experimento COSY. En la Figura 7.4 se señala la correlación entre los hidrógenos con desplazamientos δ = 6.76 y 6.96 ppm, los cuales se encuentran en la región aromática. Esta correlación es debida a las interacciones entre H-2' con H-3' y H-5' con H-6'. Por otro lado, no se identificó la correlación entre H-6 y H-7 debido a que las señales se superponen.

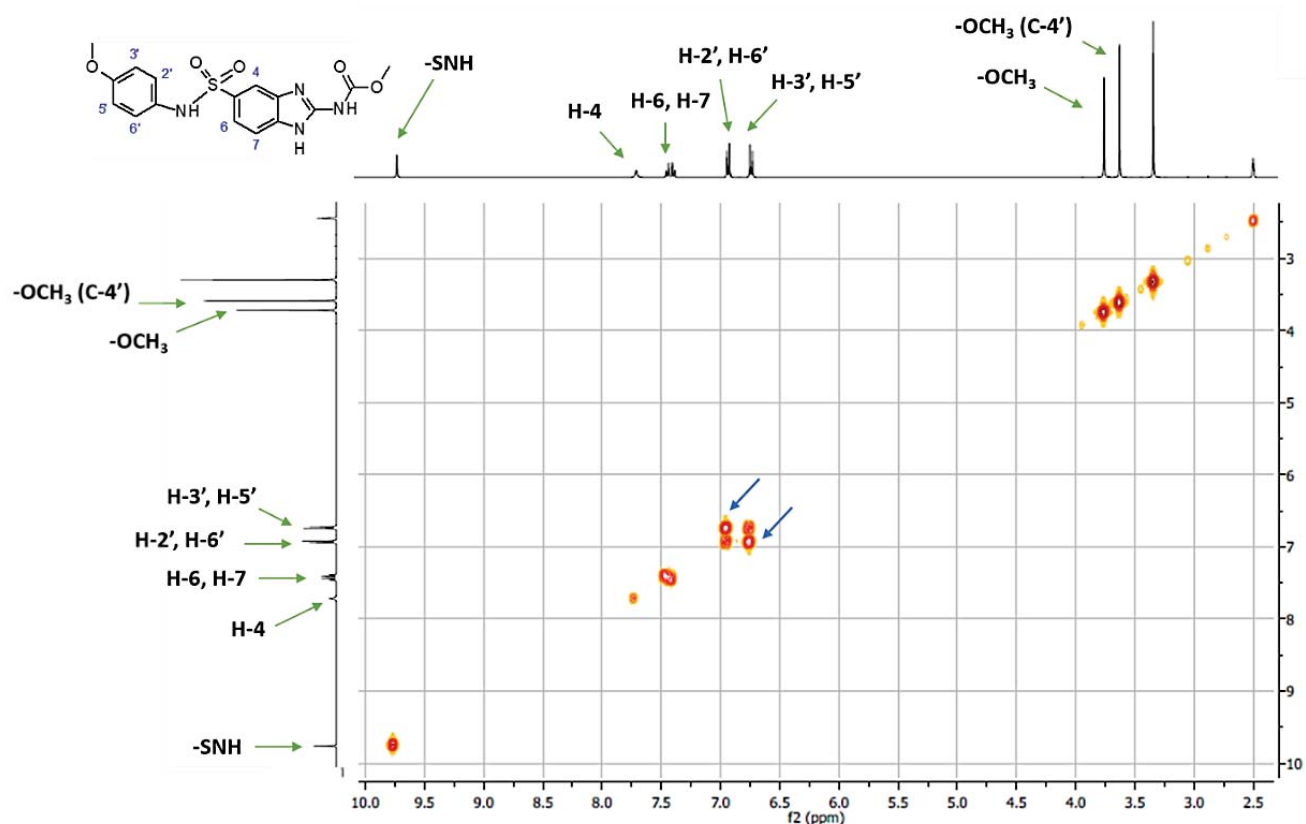


Figura 7.4. Espectro COSY de PCZ4. Con flechas azules se señala la correlación entre las señales con desplazamientos $\delta = 6.76$ y 6.96 ppm.

Posteriormente se analizó el experimento HSQC de la molécula PCZ4 para identificar las correlaciones entre el hidrógeno y el carbono al cual está enlazado. En la Figura 7.5 se muestra una ampliación del área donde se encuentran las señales. Con éste es posible asignar cada hidrógeno al carbono al que está unido, excepto con H-4 donde no se registró la correlación necesaria. Asimismo, no se registraron correlaciones entre carbonos cuaternarios o nitrógenos con hidrógenos.

El experimento HMBC fue requerido para asignar los carbonos cuaternarios C-2, C-5, C-1', C-4' y el carbono del grupo carbonilo; sin embargo, no se identificaron las señales de los carbonos cuaternarios C-3a y C-7a en ninguna de las moléculas analizadas. En la Figura 7.6 se señalan las correlaciones halladas en este experimento.

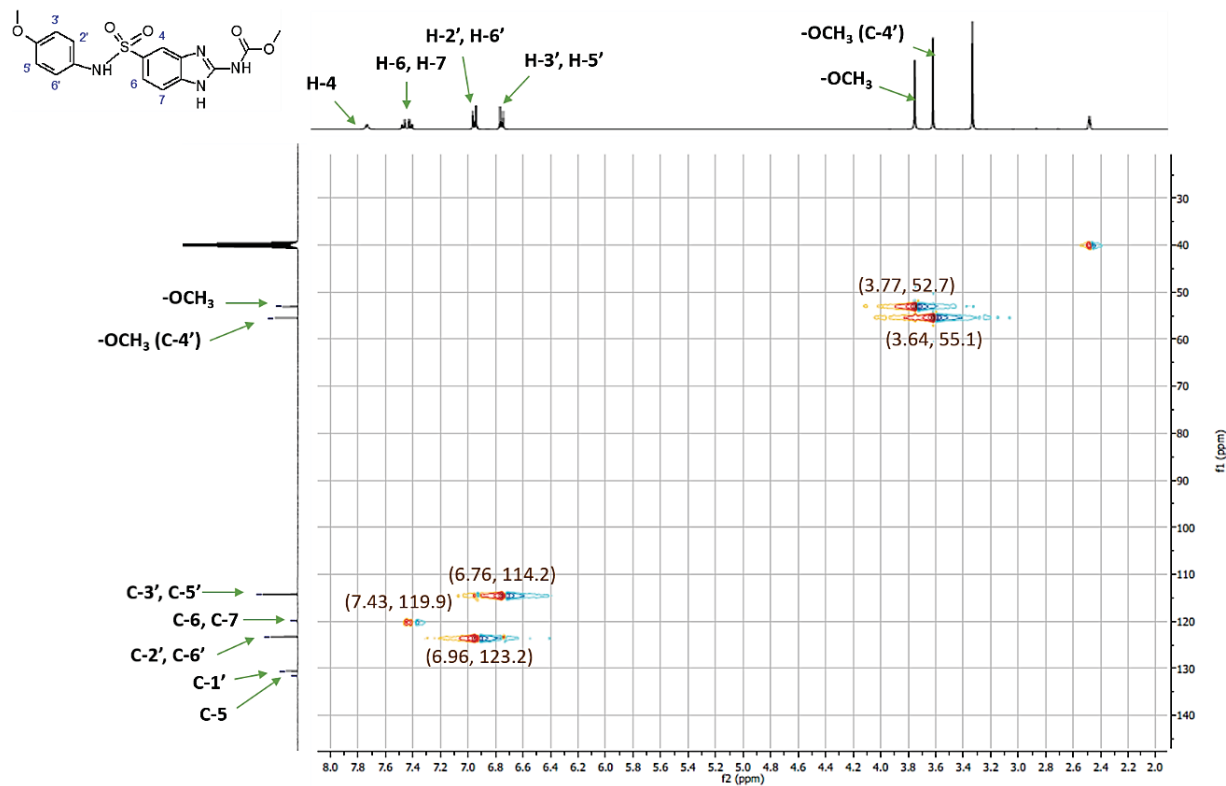


Figura 7.5. Espectro del experimento HSQC de PCZ4.

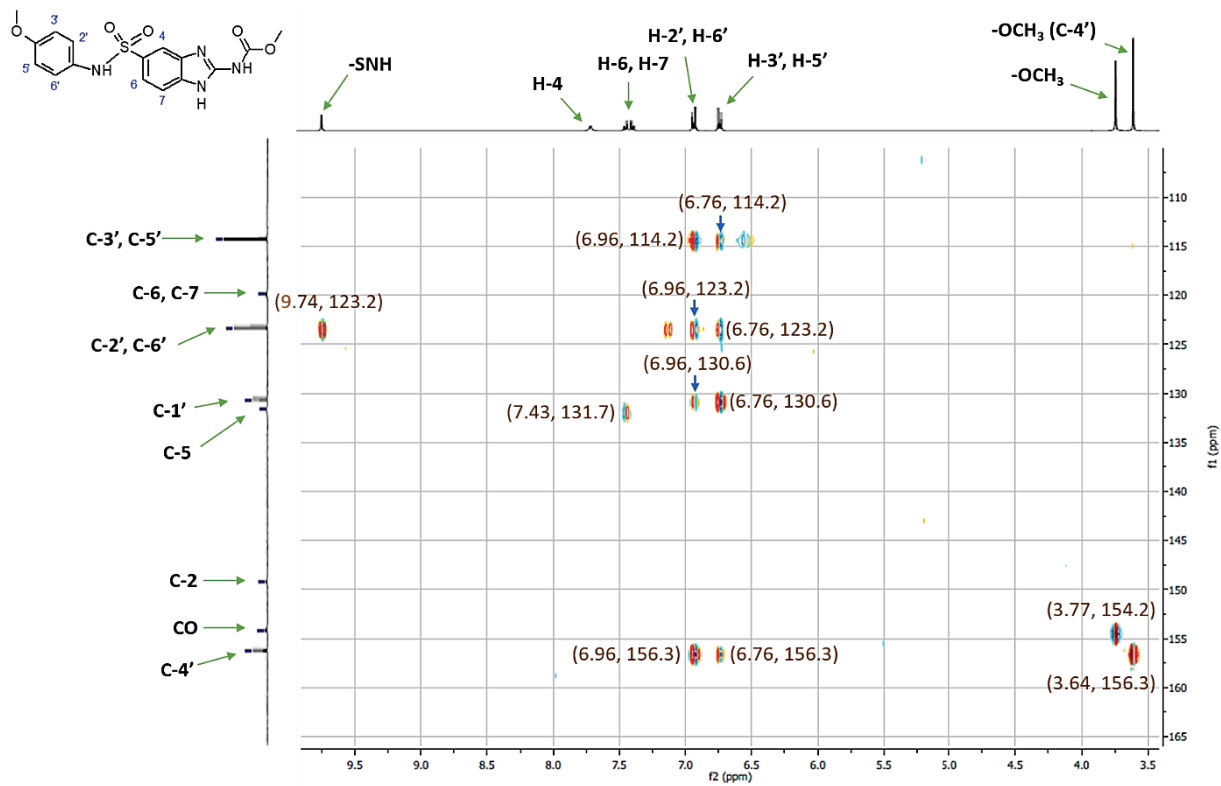


Figura 7.6. Espectro del experimento HMBC de PCZ4.

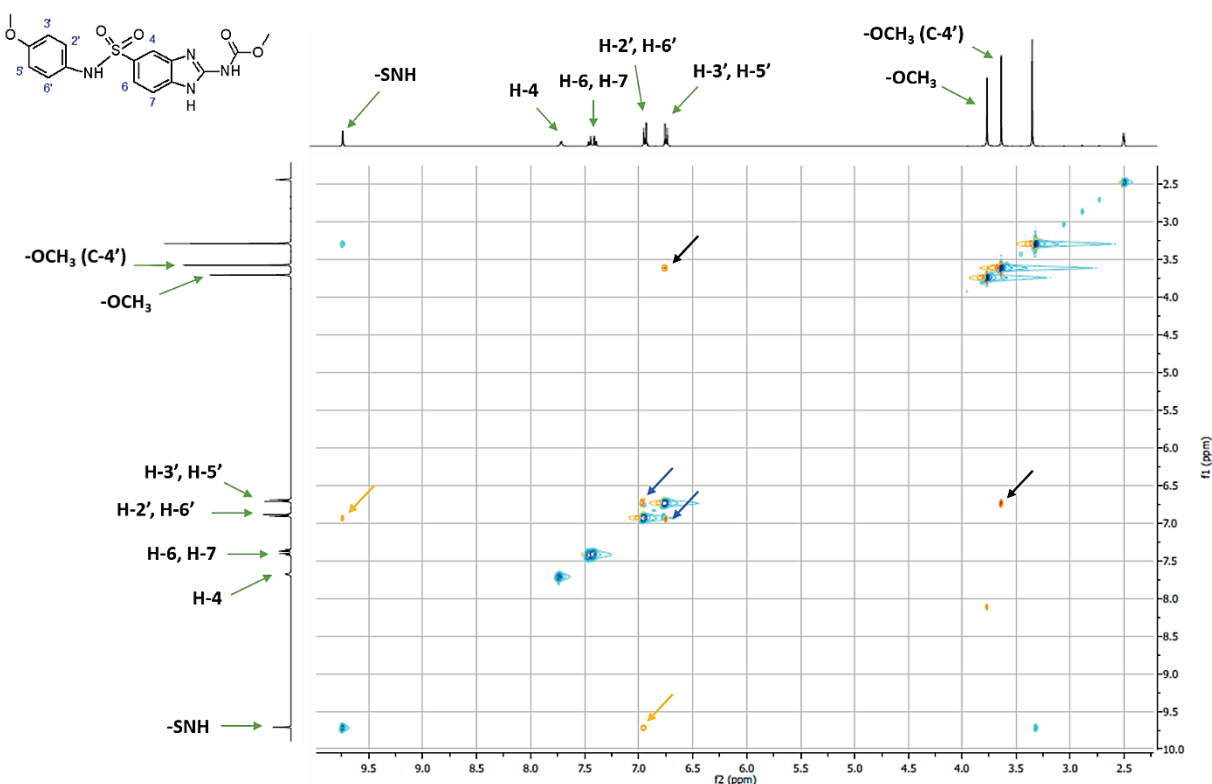


Figura 7.7. Espectro NOESY de PCZ4. Con flechas se señala la correlación entre las señales: azules $\delta= 6.76$ y 6.96 ppm; negras $\delta= 3.64$ y 6.76 ppm; y amarillas $\delta= 6.96$ y 9.74 ppm.

Finalmente, empleando el experimento NOESY se hallaron las correlaciones entre hidrógenos con una localización cercana en el espacio. En la Figura 7.7 se muestran las correlaciones identificadas; las cuales son entre los hidrógenos con desplazamientos: 6.76 y 6.96 ppm; 3.64 y 6.76 ppm; y, 6.96 y 9.74 ppm. Éstas se emplearon para asignar hidrógenos enlazados a los carbonos en posición $2'$, $3'$, $5'$, y $6'$.

La caracterización estructural de los compuestos PCZ se realizó de manera similar; los espectros correspondientes se encuentran en el Anexo II.2. Posterior a ella, se realizó la evaluación biológica de los nuevos derivados.

7.3. Análisis de la actividad biológica *in vitro*

7.3.1. Determinación de la actividad citotóxica

Como primera parte de la evaluación farmacológica de los nuevos derivados bencimidazólicos, se comprobó que presentaran actividad citotóxica sobre líneas celulares de cáncer. Para ello, se determinó la CI_{50} de los compuestos PCZ en las líneas SK-LU-1, SW620 y MCF7.

En la Tabla 7.7 se resumen los valores de CI_{50} de la serie PCZ, así como de las referencias NZ y cisplatino. Los ensayos se realizaron por triplicado, durante 72 h de exposición al tratamiento; al finalizar, se evaluó la viabilidad mediante un ensayo de MTT. Además, se muestran los valores reportados para el derivado con mayor actividad de la serie LCG (LCG1)⁴⁶ mismo que se empleará para contrastar su efecto con respecto a los PCZ y NZ. Por otro lado, también se reportan en la Tabla 7.7 las determinaciones realizadas en macrófagos THP-1, empleadas como control de células no cancerígenas.

Tabla 7.7. Resultados de actividad citotóxica en líneas celulares

Compuesto	CI_{50} (μM)			
	SK-LU-1	SW620	MCF7	THP-1
PCZ1	46.87 ± 1.727	>50	>50	>50
PCZ2	19.41 ± 0.535	29.18 ± 1.504	>50	ND
PCZ3	15.31 ± 1.390	18.33 ± 1.689	>50	ND
PCZ4	11.70 ± 1.058	10.77 ± 0.567	14.51 ± 0.704	>50
PCZ5	41.28 ± 1.893	>50	>50	ND
PCZ6	>50	>50	>50	ND
NZ	0.077 ± 0.0021	0.056 ± 0.0023	0.14 ± 0.012	>10
Cisplatino	10.72 ± 0.334	8.03 ± 0.253	9.22 ± 0.890	9.91 ± 0.686
LCG1	0.076 ± 0.005 ⁴⁶	0.082 ± 0.006 ⁴⁶	>10 ⁴⁶	>10

ND: No determinado. ⁴⁶Datos de CI_{50} reportados previamente por A. Romero Velasquez.

Como puede observarse, los valores de CI_{50} obtenidos para los derivados PCZ son casi 150 veces superiores al del NZ y LCG1 en las líneas SK-LU-1, SW620 y MCF7. De manera general, la serie PCZ presentó muy poca potencia comparada con los compuestos LCG y NZ. No obstante, los PCZ tienen la ventaja de ser aproximadamente 5 veces más solubles que la primera serie; dado que es posible suministrar concentraciones de tratamiento hasta 50 μM que no podían administrarse en la primera serie de derivados LCG debido a que los compuestos precipitaban a concentraciones superiores de 10 μM ⁴⁶.

Por otra parte, los compuestos más activos de la serie PCZ son los que presentan un grupo metoxilo en el sustituyente aromático; siendo favorecida la actividad de acuerdo con la posición del metoxilo con respecto al grupo amino: (PCZ4) *para* > (PCZ3) *meta* > (PCZ2) *orto*. Además, en posición *para*, el único sustituyente que mejora la actividad citotóxica con respecto a PCZ1, que no tiene sustituciones en el anillo, es el grupo metoxilo (PCZ4) sobre los halógenos flúor (PCZ5) y cloro (PCZ6). El efecto en la actividad de las sustituciones en el anillo de fenilo podría deberse a la orientación del grupo metoxilo en el sitio de unión, el cual está próximo al sitio de la colchicina³⁴. Es necesario realizar un estudio de acoplamiento molecular para analizar la orientación de los compuestos en el sitio de unión y contrastar los valores de CI₅₀ contra la energía de unión.

El derivado con mayor actividad citotóxica es el PCZ4, misma que es semejante a la del fármaco cisplatino; asimismo, su actividad es constante en las tres líneas de cáncer. Es importante notar que en la línea celular MCF7 únicamente PCZ4 presenta actividad citotóxica además del NZ y cisplatino; esto lo hace aún más interesante porque los derivados bencimidazólicos de la serie LCG no son activos a concentraciones menores a 10 µM ante estas células debido a su escasa solubilidad acuosa, como fue reportado⁴⁶.

En cuanto al control de citotoxicidad en células no cancerígenas, primero se intentó evaluar en un cultivo primario de CMSP, pero se presentaron diferentes eventualidades que dificultaron la determinación de CI₅₀ confiables. La primera de ellas se debió a que este tipo de células no son adherentes como el resto de las líneas celulares evaluadas y el precipitado de formazán que no pudo cuantificarse porque al estar las células en suspensión, el formazán formado en el interior de las células era succionado junto con ellas en el momento de retirar el medio de cultivo. Entonces se procedió a emplear la metodología del XTT, que tiene el mismo fundamento experimental que el MTT; sin embargo, en la determinación en CMSP se presentaron interferencias no identificadas que produjeron la reducción del XTT tanto en tratamientos como en pozos control. Por estas las razones, se procedió a cambiar la línea para evaluar la toxicidad de los compuestos. En este punto, se eligió a las células THP-1 diferenciadas a macrófagos porque en esta fase no son capaces de dividirse y se han reportado como controles de citotoxicidad de compuestos, además son células adherentes y puede emplearse el método de MTT.⁷³⁻⁷⁵

En la evaluación de la citotoxicidad en macrófagos THP-1 se empleó el cisplatino como control positivo. Como se puede comprobar en la Tabla 7.7, el cisplatino es el único con actividad citotóxica en THP-1; mientras que los derivados PCZ1, PCZ4, LCG1 y NZ no presentaron actividad sobre esta línea celular que no se divide. Por tanto, es posible que estos derivados bencimidazólicos no sean tóxicos en células normales a concentraciones superiores a su CI_{50} en líneas de cáncer humanas. Sin embargo, debido a que no se obtuvo una CI_{50} en esta línea celular, no se consiguió calcular el índice de selectividad de los compuestos.

Finalmente, como control, se monitorizaron los cambios morfológicos ocurridos a 24, 48 y 72 h de incubación con los compuestos a su respectiva CI_{50} . A pesar de que los cambios se presentan en las líneas estudiadas, éstos son más evidentes en la línea celular SK-LU-1 debido a que son de mayor tamaño y morfología poligonal. En la Figura 7.8 se muestran las células a lo largo del tiempo de exposición (ver imágenes completas en el Anexo 3.II).

En estas imágenes se observa que la serie PCZ, LCG1 y NZ promueven que un alto número de células adquieran una morfología esférica desde 24 h de tratamiento comparado contra el control. Es preciso aclarar que en el control, las células con morfología esférica corresponden a aquellas en proceso de división;⁷⁶ sin embargo, con los tratamientos no es posible afirmar, simplemente por la morfología esférica, que se encuentran arrestadas en esta fase del ciclo celular. Aunque, este cambio morfológico sugiere que los compuestos evaluados interfieren con la estructura de los microtúbulos como se ha probado con diversos MTAs como taxol, vinblastina, colchicina e inclusive, NZ.^{76,77}

Por otro lado, bajo la exposición al cisplatino no aumentó la cantidad de células esféricas (ver Anexo 3.II) dado que actúa causando daños sobre el ADN,^{78,79} siendo diferente su mecanismo de acción al propuesto para los carbamatos bencimidazólicos por unión a la β -tubulina e interferencia en la dinámica de los microtúbulos.

A 48 y 72 h de incubación con los diferentes tratamientos, se observa un aumento de células muertas y fragmentos celulares en el medio; siendo más evidente con PCZ4 y LCG1.

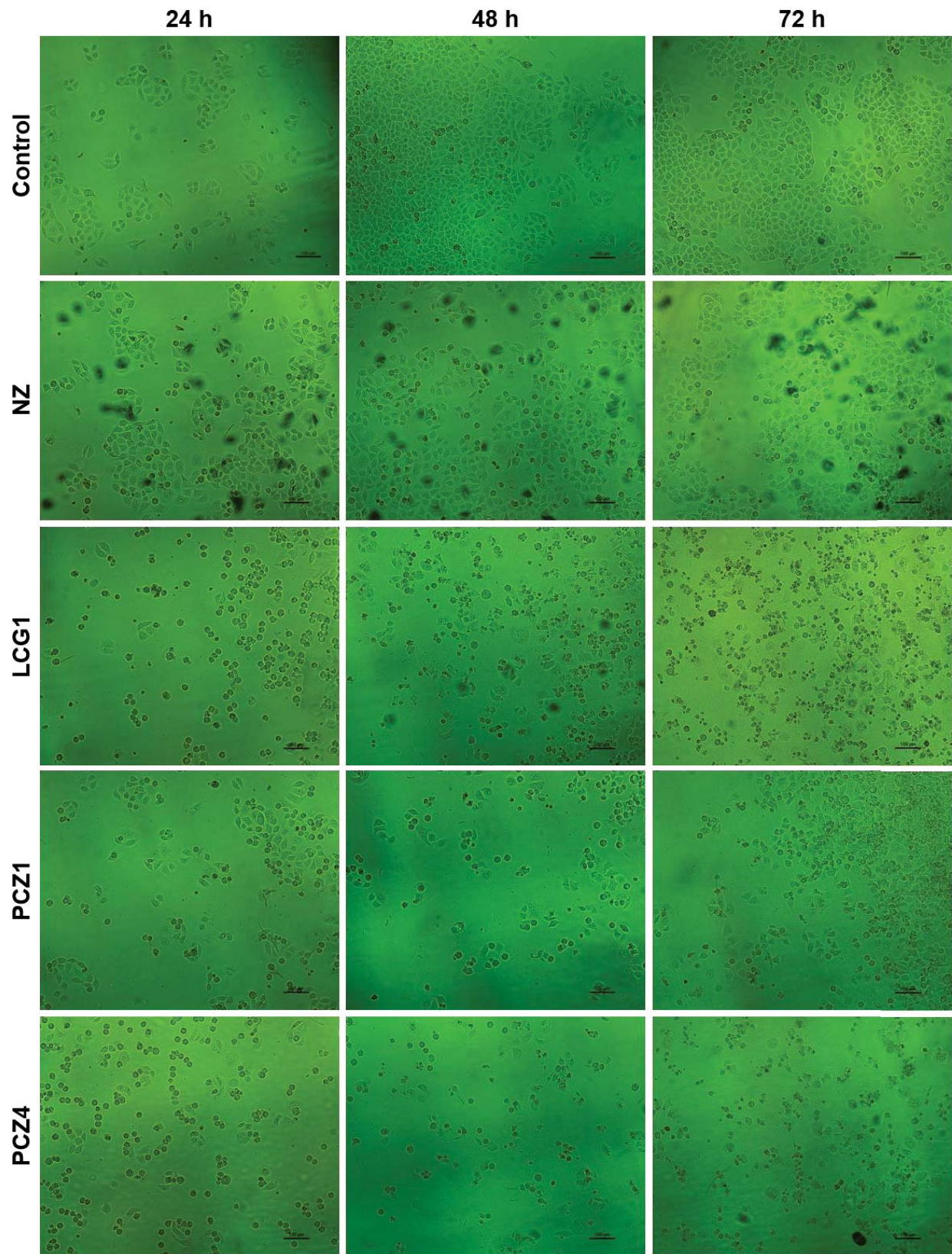


Figura 7.8. Cambios morfológicos en las células SK-LU-1 inducidos por los tratamientos NZ (0.08 μM), LCG1 (0.08 μM), PCZ1 (46.9 μM) y PCZ4 (11.7 μM) a su Cl_{50} : 24, 48 y 72 h (20x).

De las evaluaciones realizadas, se obtuvo que los compuestos PCZ producen cambios en la morfología celular y promueven la muerte celular a tiempos de exposición prolongados. Destaca el derivado PCZ4 por su mayor actividad citotóxica en las líneas SK-LU-1, SW620 y MCF7, aunque ésta es menor con respecto al NZ. Por otra parte, PCZ4 no mostró actividad citotóxica sobre macrófagos THP-1, por lo cual podría ser considerado como de nula o baja toxicidad en células sanas.

7.3.2. Ensayo de inhibición de la polimerización de la tubulina

Dado que los compuestos PCZ presentaron actividad citotóxica, es necesario comprobar que ésta se lleve a cabo a través del mecanismo propuesto. Por ello se evaluó el efecto sobre la polimerización de la tubulina en un modelo *in vitro*. Se empleó el kit comercial Cytoskeleton® (Cat # BK004P) según la metodología descrita por el proveedor; en la Figura 7.9 se muestran los resultados del ensayo.

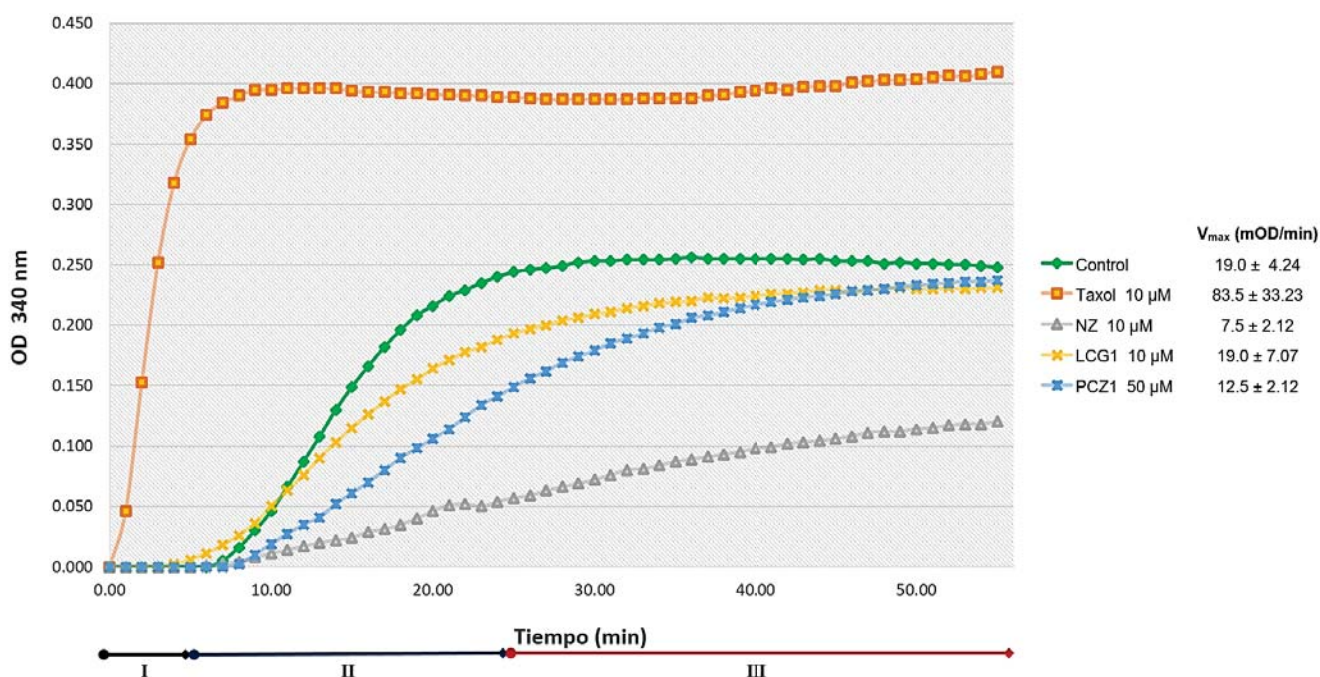


Figura 7.9. Inhibición de la polimerización de la tubulina *in vitro* por los compuestos Taxol 10 μ M, NZ 10 μ M, LCG1 10 μ M y PCZ1 50 μ M. Se realizó una lectura por minuto de la absorbancia (OD 340 nm) durante una hora de incubación. El Taxol fue empleado como control de polimerización, mientras que el NZ como control de inhibición de la polimerización. Las fases de polimerización señaladas son: I (nucleación), II (crecimiento) y III (estado estable).

En este ensayo sólo fue posible evaluar un compuesto de cada serie de derivados bencimidazólicos (LCG y PCZ) debido al número limitado de determinaciones que se pueden realizar con el mismo. El compuesto de la serie PCZ que se estudió fue el PCZ1 y cada curva se determinó por duplicado.

Las curvas de polimerización obtenidas para los controles de polimerización, taxol, y despolimerización, NZ, así como la curva de polimerización sin tratamiento corresponden a las reportadas en la literatura.^{61,80-83} No obstante, en el caso de los compuestos PCZ1 y LCG1⁴⁶ no se obtuvo una disminución significativa de la polimerización de la tubulina, como se puede observar en la Figura 7.9; a pesar de que la fase de crecimiento se prolonga con estos compuestos, ambas curvas alcanzan una fase estable similar al control sin tratamiento, lo cual no ocurre en el caso del NZ.

Por otro lado, se determinaron los valores de V_{max} de polimerización de la tubulina de cada compuesto (Figura 7.9). Para las curvas control, la V_{max} calculada coincide con lo reportado; esto es, control: 17-25 minOD/min; Taxol: 45-70 minOD/min; NZ: 3 minOD/min.^{80,83} Sin embargo, la desviación estándar del taxol es mayor ya que la fase de nucleación prácticamente se elimina e inicia la de crecimiento, en consecuencia, un ligero retardo en la lectura afecta en el registro de la velocidad.

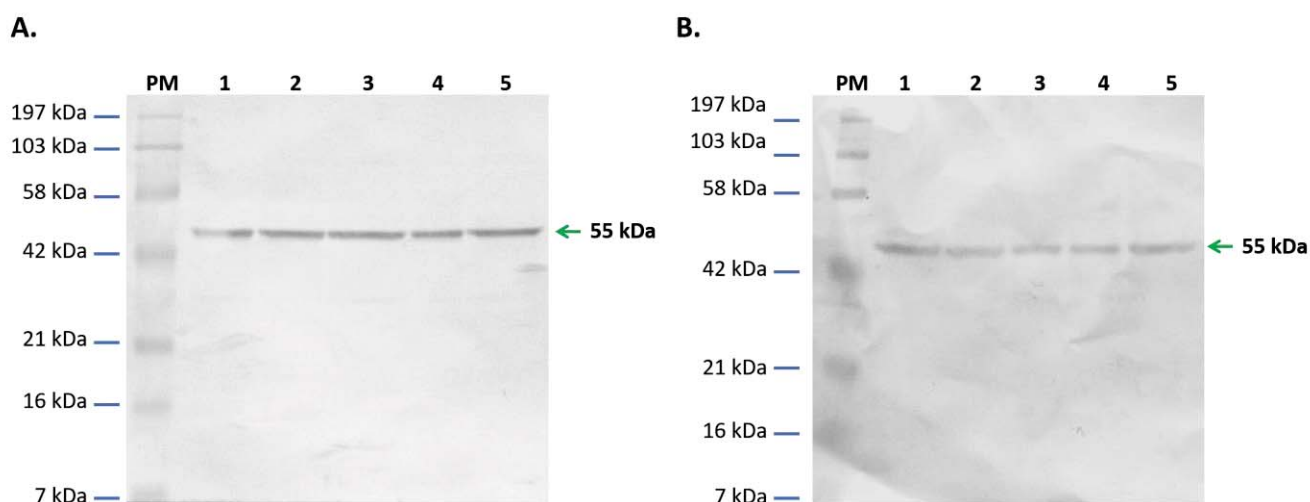
En el caso de los derivados LCG1 (19.0 ± 7.07 minOD/min) y PCZ1 (12.5 ± 2.12 minOD/min), al contrario de lo esperado, no presentan diferencia significativa (ANOVA, $p < 0.05$) con respecto al control. Sin embargo, es importante mencionar que en este ensayo, particularmente, la solubilidad acuosa impacta de manera significativa en el efecto de los compuestos por las condiciones en las que se realiza. Por tanto, es posible que, debido a la escasa solubilidad de estos derivados, el efecto de inhibición de la polimerización de la tubulina *in vitro* no fue observado.

7.3.3. Análisis por *Western blot* de la tubulina soluble y polimerizada

Los microtúbulos se encuentran en un equilibrio dinámico con los dímeros de tubulina: tubulina polimerizada formado los microtúbulos y despolimerizada o soluble en el citoplasma;^{12,84} sin embargo, este equilibrio se ve afectado con el tratamiento de MTAs como el taxol, colchicina

o vinblastina.¹⁹ Con la finalidad de comprobar el efecto de los derivados bencimidazólicos (PCZ1, PCZ4, LCG1 y el control positivo NZ) sobre la polimerización de los microtúbulos en células SK-LU-1, se procedió a analizar la cantidad de tubulina presente en forma soluble y polimerizada.

En la Figura 7.10 se muestran los resultados del efecto en la polimerización de la tubulina en las células causado por los compuestos NZ, LCG1, PCZ1 y PCZ4 a su Cl_{50} , después de 24 h con el tratamiento. Se identificaron las bandas marcando la β -tubulina, ya que forma un heterodímero con la α -tubulina y basta cuantificar uno de los dos monómeros para predecir la cantidad de tubulina presente en las fracciones.



C.

Carril	Tratamiento	Tubulina soluble (%)	Incremento (%)	Tubulina polimerizada (%)	Reducción (%)
1	Control	100.0	0.0	100.0	0.0
2	NZ	111.55	11.55	88.49	11.51
3	LCG1	114.97	14.97	74.44	25.56
4	PCZ1	117.96	17.96	79.21	20.79
5	PCZ4	120.38	20.28	96.48	3.52

Figura 7.10. Efecto en la polimerización de la tubulina por los compuestos NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M), a su Cl_{50} . A. *Western blot* de la tubulina soluble. B. *Western blot* de la tubulina polimerizada. C. Análisis densitométrico (%) de la cantidad de tubulina soluble y polimerizada con los tratamientos por cada 30 μ g de proteína, tomando al control como 100% de tubulina.

Como es posible observar en el análisis del *Western blot* de las fracciones de tubulina soluble, los carbamatos bencimidazólicos evaluados producen un incremento en la concentración de

tubulina soluble en células tratadas con respecto al control sin tratamiento, es decir, hay una acumulación de tubulina no polimerizada en el citoplasma. Este aumento es mayor en las células tratadas con el compuesto PCZ4, inclusive que mayor al control NZ.

Por otro lado, en el análisis del *Western blot* de tubulina polimerizada, disminuye la cantidad de tubulina polimerizada en las fracciones extraídas en las en comparación con el control sin tratamiento. En este caso, se obtuvo una menor cantidad de tubulina polimerizada en las células tratadas con LCG1.

El efecto observado en este experimento es semejante al inducido por otros compuestos reportados que inhiben la polimerización de los microtúbulos; por ejemplo, la podofilotoxina en células HeLa, CA-4 y colchicina en células A549.^{61,85,86} Los resultados indican que compuestos PCZ1, PCZ4 y LCG1 interfieren con la dinámica de los microtúbulos, actuando como inhibidores de la polimerización de los microtúbulos.

El efecto demostrado en experimento es contradictorio al ensayo de inhibición de la polimerización de la tubulina; sin embargo, aquí no se presentaron interferencias por la solubilidad de los derivados y se resalta la necesidad de repetir la primera evaluación.

7.3.4. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Continuando con la evaluación del efecto de los compuestos a nivel celular y en busca de reforzar los resultados del experimento anterior, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta marcando la β -tubulina para estudiar los cambios en su distribución producidos por los derivados bencimidazólicos. Para ello, se sembraron células SK-LU-1 sobre cubreobjetos de vidrio y se les administraron los compuestos NZ, LCG1, PCZ1 y PCZ4 a su respectiva CI_{50} durante 24 h de exposición.

Como se puede observar en la Figura 7.11, los compuestos evaluados interfieren con la distribución de la β -tubulina (ver Anexo III.3). En el control sin tratamiento se advierten células durante la interfase con una red densa y normal de microtúbulos; también, el huso mitótico de las células en división.

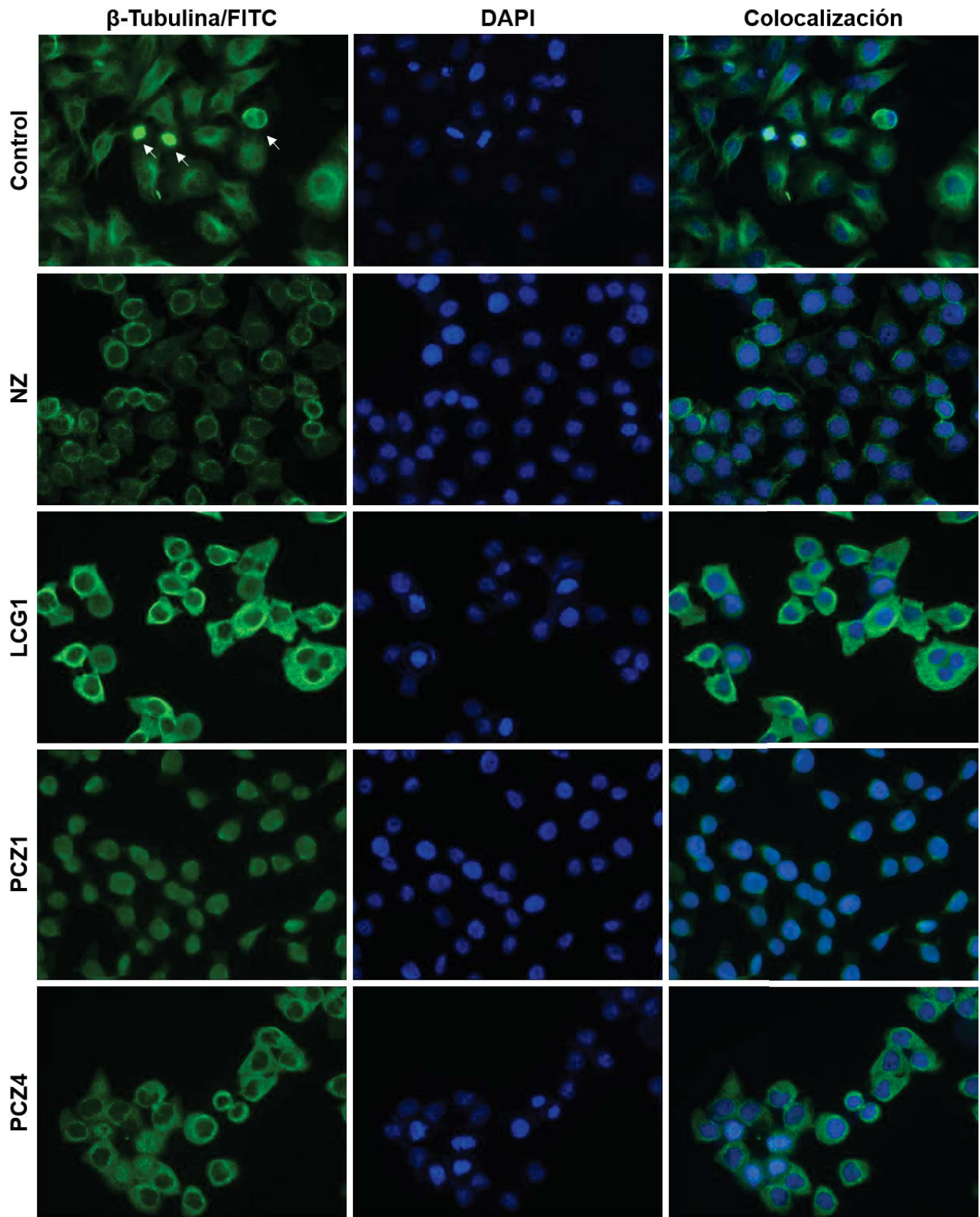


Figura 7.11. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con NZ (0.08 μ M), LCG1 (0.08 μ M), PCZ1 (46.9 μ M) y PCZ4 (11.7 μ M) a su CI_{50} , durante 24 h (40x). Con flechas se señala el huso mitótico de células en división.

En cambio, con los derivados bencimidazólicos la red de microtúbulos no tiene la misma nitidez e intensidad. Sin embargo, los efectos causados por cada tratamiento, mismos que se describirán adelante, no son semejantes entre sí pese a que en campo claro (Figura 7.8) es común el aumento de células con morfología esférica.

En las células tratadas con NZ y PCZ1, el citoplasma se ve disminuido de tamaño y el núcleo ocupa la mayor parte de la célula; además hay una acumulación de β -tubulina rodeando al núcleo y es muy evidente la pérdida de la estructura de microtúbulos durante la interfase, así como del huso mitótico. Particularmente, los efectos de reducción del citoplasma y pérdida de la estructura de los microtúbulos que presenta el control NZ por su unión a la β -tubulina, son similares a lo reportado en las líneas celulares de cáncer SGC-7901 (0.08 μ M, 24 h), HT-1080 (0.14 μ M, 24 h), COS-7 (10 μ M, 24 h) y A375 (0.3 μ M, 18 h).^{36,87,88} A 24 h de exposición, PCZ1 induce un efecto semejante en la distribución de la β -tubulina al NZ, a su CI_{50} respectiva en las células SK-LU-1.

Por otro lado, en los tratamientos con LCG1 y PCZ4 destaca la presencia de células multinucleadas y husos mitóticos multipolares. Estos cambios coinciden con los producidos por el derivado bencimidazólico Carbendazim a concentraciones mayores⁸⁹ y a otras moléculas que afectan la dinámica de los microtúbulos, tales como taxol, vinblastina, colchicina y NZ.^{19,21,22,90} El mecanismo por el cual se generan células multinucleadas y husos mitóticos irregulares está ampliamente relacionado con la interferencia en la dinámica de los microtúbulos (ver Figura 2.4);^{21,22} por tanto, estos resultados refuerzan que los compuestos LCG1 y PCZ4 inducen este efecto tras impedir la polimerización de los microtúbulos por su posible unión con la β -tubulina.

De la modificación en la distribución de la β -tubulina en las células SK-LU-1 causada por los derivados bencimidazólicos evaluados, se comprueba que estos compuestos interfieren en la dinámica de los microtúbulos. Dicho cambio puede derivar en dos consecuencias dependientes del nivel de afectación en los microtúbulos: primero, a un arresto del ciclo celular en la fase G2/M, del cual las células salen anormalmente y originan células multinucleadas,^{19,89,90} mismas que fueron observadas con LCG1 y PCZ4; y segundo, en un desperfecto general en funciones relacionadas con los microtúbulos¹⁹. Ambos fenómenos son

los mecanismos principales descritos para MTAs que pueden desencadenar muerte celular por apoptosis.^{19,89} Por tanto, es posible que PCZ1, PCZ4 y LCG1 promuevan arresto celular en G2/M y, con ello, podrían conducir a apoptosis como mecanismo de muerte celular.

7.3.5. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta

Como ya se mencionó, los MTAs promueven arresto mitótico al interferir con la dinámica de los microtúbulos; además se observaron cambios de distribución de la β -tubulina que sugieren que los derivados bencimidazólicos evaluados detienen a las células SK-LU-1. Con el objetivo de analizar si los compuestos de estudio presentan el mismo efecto que los MTAs reportados, se procedió a detallar el efecto de los derivados estudiados sobre la fase G2/M del ciclo celular. Para ello, se estudió la presencia de ciclina B en las células SK-LU-1 tratadas con NZ, LCG1, PCZ1 y PCZ4, a su CI_{50} , al término de 24 h.

En este ensayo se marcó a la ciclina B puesto que esta proteína se acumula en la fase G2, alcanzando un pico de concentración, y después se degrada al inicio de la mitosis (M) cuando los cromosomas han sido correctamente alineados. Su función es, precisamente, regular la transición G2/M y promover el avance del ciclo celular.^{26,27,91,92}

Los cambios en la presencia de ciclina B inducidos por compuestos evaluados en las células SK-LU-1 se muestran en la Figura 7.12 (ver Anexo III.4). En cuanto al control sin tratamiento hay algunas células marcadas con ciclina B (13.9%) debido a que no fueron sincronizadas al inicio; por tanto, es posible encontrarlas en diferentes fases del ciclo celular. En contraste con el control sin tratamiento, se produjo un incremento cercano al doble del número de células marcadas ante los compuestos LCG1 (48.6%), PCZ1 (42.9%) y PCZ4 (44.0%), incluso mayor que con NZ (38.7%), usado como control positivo⁹³⁻⁹⁵.

Otro aspecto notable es que, en la mayoría de las células esféricas marcadas, la cromatina no está posicionada en la placa metafásica como ocurre en el caso del control; en cambio, se encuentra condensada en el centro de las células. Esto podría ser causado porque al no formarse adecuadamente el huso mitótico, no avanzan en el ciclo celular correctamente hasta la metafase; mostrando el mismo efecto que los MTAs, tales como taxol, vinblastina, colchicina y NZ.²²

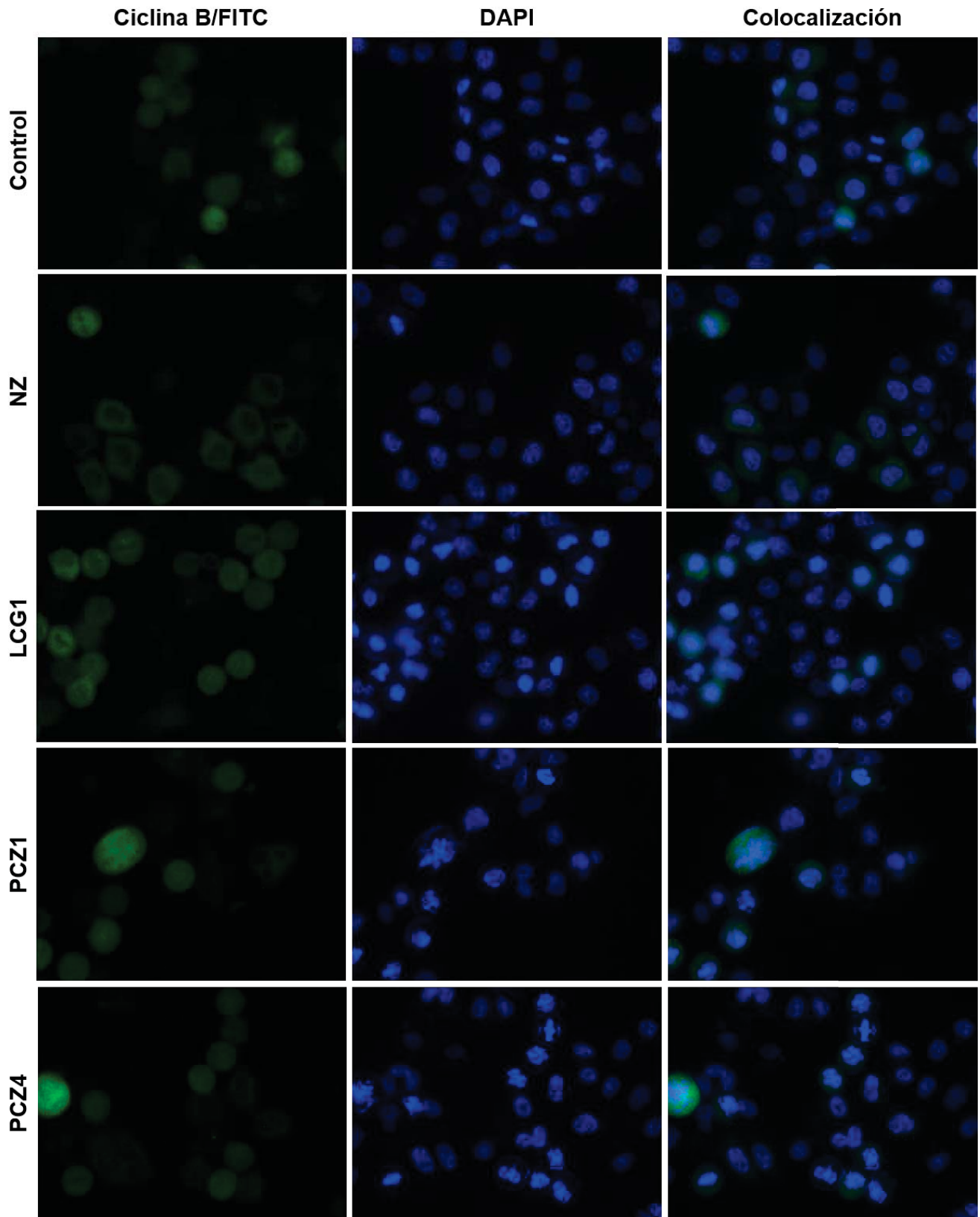


Figura 7.12. Cambios en la presencia de ciclina B en células SK-LU-1 inducidos NZ (0.08 μM), LCG1 (0.08 μM), PCZ1 (46.9 μM) y PCZ4 (11.7 μM) a su Cl_{50} , durante 24 h (40x).

De este ensayo se comprobó que los derivados bencimidazólicos evaluados producen un aumento de células marcadas con ciclina B, lo cual indica que los compuestos inducen arresto en la fase G2/M; ocasionado por la interferencia en la dinámica de los microtúbulos.

Finalmente, con los experimentos realizados, se estudió si el mecanismo de acción de los derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarmato de metilo evaluados en células de cáncer es el mismo que el descrito para el NZ, derivado ampliamente estudiado. De ellos se obtuvo lo siguiente: primero, los compuestos LCG1, PCZ1 y PCZ4 interfieren con la dinámica de los microtúbulos y, posteriormente, promueven el arresto en la fase G2/M. Sin embargo, aún falta concluir la caracterización del mecanismo de muerte celular para confirmar si es por apoptosis como se ha reportado con diversos compuestos que tienen como blanco a los microtúbulos;¹⁹ y realizar los estudios de acoplamiento molecular para correlacionarlos con la actividad citotóxica de los compuestos.

8. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y caracterizaron seis compuestos derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo con rendimientos moderados; donde la reacción limitante fue la Sustitución Electrofílica Aromática. Es necesario continuar con el estudio de las condiciones en las que se lleva a cabo este paso para lograr un aumento del rendimiento de reacción.
- Los nuevos derivados de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, con un grupo sulfonamido en 5(6), PCZ1-PCZ5, presentaron actividad antiproliferativa en líneas celulares de cáncer. El compuesto PCZ4 fue el más activo de la serie, con valores de CI_{50} entre 10.8 y 14.5 μ M en las líneas SK-LU-1, SW620 y MCF7; actividad similar al cisplatino. Asimismo, PCZ4 no presentó actividad citotóxica en los macrófagos THP-1 a una concentración $<50 \mu$ M, empleados como control de citotoxicidad en células sanas.
- El compuesto PCZ1 indujo un retardo en la fase de crecimiento y disminuyó la V_{max} de polimerización de la tubulina empleando el Kit Cytoskeleton® (Cat # BK004P), aunque este efecto no es tan evidente por los problemas de solubilidad de los derivados.
- LCG1, PCZ1 y PCZ4 tienen efecto inhibitor sobre la polimerización de la tubulina en células SK-LU-1, incrementando la cantidad de tubulina soluble en el citoplasma.
- LCG1, PCZ1 y PCZ4 inducen cambios en la distribución de la β -tubulina, así como en la morfología de células SK-LU-1. Los compuestos PCZ4 y LCG1 promueven la formación de células multinucleadas y husos mitóticos multipolares. PCZ1 induce reducción del citoplasma y pérdida de la estructura de los microtúbulos, semejante a lo observado con el NZ.
- El aumento de ciclina B en las células SK-LU-1 tratadas con LCG1, PCZ1 y PCZ4 indica arresto de las células en fase G2/M ocasionado por la interferencia con la dinámica de los microtúbulos.

9. PERSPECTIVAS

- Estudiar el mecanismo de acoplamiento molecular de los compuestos de la serie PCZ en las isoformas de la β -tubulina: HsBT1, HsBT3 y HsBT6.
- Excluir la actividad citotóxica de las series PCZ y LCG en líneas celulares hematopoyéticas sanas.
- Determinar el mecanismo molecular de muerte celular inducido por los compuestos LCG y PCZ.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cancer (2017). <http://www.who.int/es/>. [Consulta: Septiembre, **2017**]
2. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* **2017**, 67: 7–30.
3. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas de salud en establecimientos particulares, Mortalidad. <http://www.inegi.org.mx/>. [Consulta: Septiembre, **2017**]
4. Baudino, T. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2015**, 12: 3–20.
5. National Cancer Institute. Types of Cancer Treatment. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>. [Consulta: Septiembre, **2017**]
6. Vanneman, M. & Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*, **2012**, 12: 237–251.
7. Farooqi, A. A. & Ismail, M. Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements. *Springer*. **2017**. doi:10.1007/978-3-319-53082-6
8. Jackson, J. R., Patrick, D. R., Dar, M. M. & Huang, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: Can we improve on tubulin agents? *Nat. Rev. Cancer*. **2007**, 7: 107–117.
9. Amos, L. A. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, 22: 916–926.
10. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, 10: 194–204.
11. Valiron, O., Caudron, N. & Job, D. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58: 2069–2084.
12. Risinger, A. L., Giles, F. J. & Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **2009**, 35: 255–261.
13. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K., Soni, R. & Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87: 89–124.
14. Aguayo-Ortiz, R. Tesis de Licenciatura. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de bencimidazoles a la β -tubulina de helmintos y protozoarios. UNAM, **2012**.
15. Cano-González, L. Tesis de licenciatura. Síntesis y evaluación *in silico* de nuevos

- carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina. UNAM, **2015**.
16. Ferreira, J. G., Pereira, A. L. & Maiato, H. Microtubule Plus-End Tracking Proteins and Their Roles in Cell Division. International Review of Cell and Molecular Biology. *Elsevier Inc.*, **2014**, capítulo 2: 52–140.
 17. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. & McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* **2008**, 1785: 96–132.
 18. Bowne-Anderson, H., Zanic, M., Kauer, M. & Howard, J. Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *BioEssays.* **2013**, 35: 452–461.
 19. Mukhtar, E., Adhami, V. M. & Mukhtar, H. Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, 13: 275–284.
 20. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer.* **2004**, 4: 253–265.
 21. Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M. & Kroemer, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, 12: 385–392.
 22. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **2009**, 122: 2579–2585.
 23. Mollinedo, F. & Gajate, C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis.* **2003**, 8: 413–50.
 24. Brito, D. A., Yang, Z. & Rieder, C. L. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *J. Cell Biol.* **2008**, 182: 623–629.
 25. Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through: What happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell.* **2004**, 7: 637–651.
 26. Ito, M. Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol Biol.* **2000**, 43: 677–690.
 27. Hershko, A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **1999**, 354: 1571–1576.
 28. Shamitko-Klingensmith, N., Boyd, J. W. & Legleiter, J. Microtubule modification influences cellular response to amyloid- β exposure. *AIMS Biophys.* **2016**, 3: 261–285.
 29. Attard, G., Greystoke, A., Kaye, S. & De Bono, J. Update on tubulin-binding agents.

- Pathol. Biol.* **2006**, 54: 72–84.
30. Ogden, A., Rida, P. C. G., Reid, M. D. & Aneja, R. Interphase microtubules: Chief casualties in the war on cancer? *Drug Discov. Today.* **2014**, 19: 824–829.
 31. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K. au., Soni, R. & Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87: 89–124.
 32. Amos, L. a. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, 22: 916–926.
 33. Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Medina-Franco, J. L. & Hernández-Campos, A. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, 45: 26–37.
 34. Wang, W., Li, C., He, L., Lei, K., Wang, F., Pu, Y., Yang, Z., Cao, D., Ma, L., Chen, J., Sang, Y., Liang, X., Xiang, M., Peng, A., Wei, Y. & Chen, L. New benzimidazole-2-urea derivatives as tubulin inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, 24: 4250–4253.
 35. Sasaki, J., Ramesh, R., Chada, S., Gomyo, Y., Roth, J. A. & Mukhopadhyay, T. The Anthelmintic Drug Mebendazole Induces Mitotic Arrest and Apoptosis by Depolymerizing Tubulin in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. **2002**, 1: 1201–1209.
 36. Guan, Q., Han, C., Zuo, D., Zhai, M., Li, Z., Zhang, Q., Zhai, Y., Jiang, X., Bao, K., Wu, Y. & Zhang, W. Synthesis and evaluation of benzimidazole carbamates bearing indole moieties for antiproliferative and antitubulin activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 87: 306–315.
 37. Dogra, N. & Mukhopadhyay, T. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by methyl N-(6-phenylsulfanyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate leads to a potent cytotoxic effect in tumor cells: A novel antiproliferative agent with a potential therapeutic implication. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287: 30625–30640.
 38. Pourgholami, M. H., Woon, L., Almajd, R., Akhter, J., Bowery, P. & Morris D.L. *In vitro* and *in vivo* suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Lett.* **2001**, 165: 43–49.
 39. Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y. & Morris, D. L. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: *In vitro* and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, 55:

- 425–432.
40. Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R. & Roth, J. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8: 2963–2969.
 41. Kale, S. S., Jedhe, G. S., Meshram, S. N., Santra, M. K., Hamel, E. & Sanjayan, G. J. Novel hybrid nocodazole analogues as tubulin polymerization inhibitors and their antiproliferative activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25: 1982-1985.
 42. Wang, Y., Zhang, H., Gigant, B., Yu, Y., Wu, Y., Chen, X., Lai, Q., Yang, Z., Chen, Q. & Yang, J. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **2016**, 283: 102–111.
 43. Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Medina-Franco, J. L., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Hernández-Luis, F. & Hernández-Campos, A. Towards the identification of the binding site of benzimidazoles to β -tubulin of *Trichinella spiralis*: Insights from computational and experimental data. *J. Mol. Graph. Model.* **2013**, 41: 12–19.
 44. Aguayo-Ortiz, R., Cano-González, L., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Dominguez, L. Structure-based approaches for the design of benzimidazole carbamate derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Chem Biol Drug Des.* **2017**, 90: 40–51.
 45. Guzmán-Ocampo, D. C. Aguayo-Ortiz, R., Cano-González, L., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Dominguez, L. Effects of the Protonation State of Titratable Residues and the Presence of Water Molecules on Nocodazole Binding to β -Tubulin. *ChemMedChem.* **2018**, 13: 20–24.
 46. Romero Velasquez, A. Tesis de Licenciatura. Evaluación de seis derivados bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina humana. UNAM. **2018**.
 47. Sharma, S. *Adv. Drug Res.* **1994**, 25: 103.
 48. Flores-Ramos, M. A. Tesis de doctorado. Síntesis y actividad fasciolicida de fosfonooximetil bencimidazoles. UNAM, **2016**.
 49. Leandro-García, L. J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Robledo, M. & Rodríguez-Antona, C. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken).* **2010**, 67: 214–223.

50. Gajewski, M. M., Tuszynski, J. A., Barakat, K., Huzil, J. T. & Klobukowski, M. Interactions of laulimalide, peloruside, and their derivatives with the isoforms of β -tubulin. *Can. J. Chem.* **2013**, 7: 1–7.
51. Magnani, M., Ortuso, F., Soro, S., Alcaro, S., Tramontano, A. & Botta, M. The β I/ β III-tubulin isoforms and their complexes with antimetabolic agents: Docking and molecular dynamics studies. *FEBS J.* **2006**, 273: 3301–3310.
52. Tommasi, S., Mangia, A., Lacalamita, R., Bellizzi, A., Fedele, V., Chiriatti, A., Thomssen, C., Kendzierski, N., Latorre, A., Lorusso, V., Schittulli, F., Zito, F., Kavallaris, M. & Paradiso, A. Cytoskeleton and paclitaxel sensitivity in breast cancer: The role of β -tubulins. *Int. J. Cancer.* **2007**, 120: 2078–2085.
53. Coley, H. M. Mechanisms and consequences of chemotherapy resistance in breast cancer. *Eur. J. Cancer Suppl.* **2009**, 7: 3–7.
54. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. & Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, 38: 890–903.
55. Wehbe, H., Kearney, C. M. & Pinney, K. G. Combretastatin A-4 resistance in H460 human lung carcinoma demonstrates distinctive alterations in β -tubulin isotype expression. *Anticancer Res.* **2005**, 25: 3865–3870.
56. Sève, P., Reiman, T. & Dumontet, C. The role of β III tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* **2010**, 67: 136–143.
57. Hetland, T. E., Hellesylt, E., Flørenes, V. A., Tropé, C., Davidson, B. & Kærn, J. Class III β -tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. *Hum. Pathol.* **2011**, 42: 1019–1026.
58. Leandro-García, L. J., Leskelä, S., Inglada-Pérez, L., Landa, I., de Cubas, A. A., Maliszewska, A., Comino-Méndez, I., Letón, R., Gómez-Graña, A., Torres, R., Ramírez, J. C., Álvarez, S., Rivera, J., Martínez, C., Lozano, M. L., Cascón, A., Mercedes Robledo, M. & Rodríguez-Antona, C. Hematologic β -tubulin VI isoform exhibits genetic variability that influences paclitaxel toxicity. *Cancer Res.* **2012**, 72: 4744–4752.
59. Escuin, D., Burke, P. A., McMahon-Tobin, G., Hembrough, T., Wang, Y., Alcaraz, A. A., Leandro-García, L. J., Rodríguez-Antona, C., Snyder, J. P., LaVallee, T. M. & Giannakakou, P. The hematopoietic-specific β 1-tubulin is naturally resistant to 2-

- methoxyestradiol and protects patients from drug-induced myelosuppression. *Cell Cycle*. **2009**, 8: 3914–3924.
60. FAFDrugs4. <http://fafdrugs3.mti.univ-paris-diderot.fr/>. [Consulta: Abril, **2015**]
61. Kamal, A., Shaik, A. B., Polepalli, S., Reddy, V. S., Kumar, G. B., Gupta, S., Krishna, K. V. S. R., Nagabhushana, A., Mishrae, R. K. & Jainb, N. Pyrazole–oxadiazole conjugates: synthesis, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12: 7993–8007.
62. Casini, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A. & Supuran, L. T. Sulfonamides and sulfonylated derivatives as anticancer agents. *Curr. Cancer Drug Targets*. **2002**, 2: 55–75.
63. Yoshimatsu, K., Yamaguchi, A., Yoshino, H., Koyanagi, N. & Kitoh, K. Mechanism of action of E7010, an orally active sulfonamide antitumor agent: Inhibition of mitosis by binding to the colchicine site of tubulin. *Cancer Res.* **1997**, 57: 3208–3213.
64. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1PII. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46: 3–26.
65. Egan, W. J., Merz, K. M. & Baldwin, J. J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *J. Med. Chem.* **2000**, 43: 3867–3877.
66. Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H., Smith, B. R., Ward, K. W. & Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, 45: 2615–2623.
67. Gleeson, M. P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J. Med. Chem.* **2008**, 51: 817–834.
68. Hughes, J. D., Blagg, J., Price, D. A., Bailey, S., DeCrescenzo, G. A., Devraj, R. V., Ellsworth, E., Fobian, Y. M., Gibbs, M. E., Gilles, R. W., Greene, N., Huang, E., Krieger-Burke, T., Loesel, J., Wager, T., Whiteley, L. & Zhang, Y. Physicochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, 18: 4872–4875.
69. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; Carbendazim. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429>. [Consulta: Enero, **2018**]

70. Merck.Sigma-Aldrich.
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/378674?lang=es®ion=MX>.
 [Consulta: Enero, **2018**]
71. Liu, X., Chen, Q., Zhu, J., Fan, Y., Ding, L., Zhao, J., Han, G., Tian, W., Qi, J., Zhou, Y. & Lv, J. Synthesis and acrosin inhibitory activity of methyl 5-substituted-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl carbamate derivatives. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, 22: 3554–3559.
72. Chen, Q., Tian, W., Han, G., Qi, J., Zheng, C., Zhou, Y., Ding, L., Zhao, J., Zhu, J., Lv, J. & Sheng, C. Design and synthesis of novel benzoheterocyclic derivatives as human acrosin inhibitors by scaffold hopping. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 59: 176–182.
73. Garcia, I., Pouzet, C., Brulas, M., Bauza, E., Botto, J. M. & Domloge, N. Evaluation of THP-1 cell line as an *in vitro* model for long-term safety assessment of new molecules. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2013**, 35: 568–574.
74. Heil, T. L., Volkmann, K. R., Wataha, J. C. & Lockwood, P. E. Human peripheral blood monocytes versus THP-1 monocytes for *in vitro* biocompatibility testing of dental material components. *J. Oral Rehabil.* **2002**, 29: 401–407.
75. Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. & Tada, K. Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester. *Cancer Res.* **1982**, 42: 1530–1536.
76. Futamura, Y., Kawatani, M., Kazami, S., Tanaka, K. & Muroi, M. Supplemental Information Morphobase , an Encyclopedic Cell Morphology Database , and Its Use for Drug Target Identification. **2012**, 19: 1620–1630.
77. Hui, L., Sang, C., Wang, D., Wang, X., Wang, M., Jia, Q., Ma, M. & Chen, S. Newly synthesized podophyllotoxin derivative, LJ12, induces apoptosis and mitotic catastrophe in non-small cell lung cancer cells *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* **2016**, 13: 339–346.
78. Drugbank. Cisplatin. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00515>. [Consulta: Enero, **2018**]
79. Dasari, S. & Tchounwou, P. B. Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **2015**, 5: 364–378.
80. Ma, P., Rahima Benhabbour, S., Feng, L. & Mumper, R. J. 2'-Behenoyl-paclitaxel conjugate containing lipid nanoparticles for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancer Lett.* **2013**, 334: 253–262.

81. Briceño, A. Muñoz, P., Brito, P., Huenchuguala, S., Segura-Aguilar, J. & Paris, I. B. Aminochrome Toxicity is Mediated by Inhibition of Microtubules Polymerization Through the Formation of Adducts with Tubulin. *Neurotox Res.* **2016**, 29: 381–393.
82. Tsai, A. C., Wang, C-Y, Liou, J-P, Pai, H-C, Hsiao, C-J, Chang, J-Y, Wang, J-C, Teng, C-M & Pan, S-L. Orally active microtubule-targeting agent, MPT0B271, for the treatment of human non-small cell lung cancer, alone and in combination with erlotinib. *Cell Death Dis.* **2014**, 5:1162.
83. Cytoskeleton ®. Tubulin Polymerization Assay Kit Manual (CDS03 and BK006). in *Tubulin Polymerization Assay Kit.* **2009**, 1–18.
84. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, 9: 309–322.
85. Kamal, A., Shaik, A. B., Polepalli, S., Kumar, G. B., Reddy, V. S., Mahesh, R., Garimella, S. & Jain, N. Synthesis of arylpyrazole linked benzimidazole conjugates as potential microtubule disruptors. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, 23: 1082–1095.
86. Kamal, A., Reddy, T. S., Polepalli, S., Shalini, N., Reddy, V. G., Rao, A. V. S., Jain, N. & Shankaraiah, N. Synthesis and biological evaluation of podophyllotoxin congeners as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2014**, 22: 5466–5475.
87. Doyle, S. R. & Chan, C. K. Differential intracellular distribution of DNA complexed with polyethylenimine (PEI) and PEI-polyarginine PTD influences exogenous gene expression within live COS-7 cells. *Genet. Vaccines Ther.* **2007**, 5: 11.
88. McNeely, S. C., Taylor, B. F. & States, J. C. Mitotic arrest-associated apoptosis induced by sodium arsenite in A375 melanoma cells is BUBR1-dependent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, 231: 61–67.
89. Yenjerla, M., Cox, C., Wilson, L. & Jordan, M. A. Carbendazim inhibits cancer cell proliferation by suppressing microtubule dynamics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, 328: 390–398.
90. Chen, J., Yang, C. H., Cammer, M. & Horwitz, S. B. Gene Expression and Mitotic Exit Induced by Microtubule-Stabilizing Drugs Gene Expression and Mitotic Exit Induced by Microtubule-Stabilizing Drugs. *Cancer Research.* **2003**, 63: 7891–7899.
91. Petri, E. T., Errico, A., Escobedo, L., Hunt, T. & Basavappa, R. The crystal structure of human cyclin B. *Cell Cycle.* **2007**, 6: 1342–1349.

92. UniProtKB. P14635 (CCNB1_HUMAN). <https://www.uniprot.org/uniprot/P14635>. [Consulta: Febrero, **2018**]
93. Ditchfield, C., Johnson, V. L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N. & Taylor, S. S. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* **2003**, 161: 267–280.
94. Zhang, G., Chen, T., Davide, J., Tao, W., Vanko, A., Connolly, B., Williams Jr., D. L. & Sur, C. Visualization of Mitotic Arrest of Cell Cycle with Bioluminescence Imaging in Living Animals. *Mol. Imaging Biol.* **2013**, 15: 431–440.
95. Holland, A. J. & Taylor, S. S. Cyclin-B1-mediated inhibition of excess separase is required for timely chromosome disjunction. *J. Cell Sci.* **2006**, 119: 3325–3336.
96. Hippel, K. S. C. & T. G. Routine and Point-of-Care Testing in Hematology: Manual and Semiautomated Methods. <https://oncohemakey.com/routine-and-point-of-care-testing-in-hematology-manual-and-semiautomated-methods/>. [Consulta, **2018**]
97. Nolta, J. A., Angeles, C. H. L. & Crooks, G. M. Hematopoietic Stem Cells. *J. Clin. Invest.* **2005**, 1–6.
98. Lund, M. E., To, J., O'Brien, B. A. & Donnelly, S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J. Immunol. Methods.* **2016**, 430: 64–70.
99. Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F. J. & Wichers, H. J. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* **2013**, 4: 266–276.
100. Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B. & Dockrell, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One.* **2010**, 5, 1: 8668.

ANEXO I. DERIVADOS DEL 1H-BENCIMIDAZOL-2-ILCARBAMATO DE METILO

Tabla I.1. Derivados del 1H-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

Compuesto	Clave	Estructura
Albendazol	ABZ	
Sulfóxido de albendazol (+)	ABZSO(+)	
Sulfóxido de albendazol (-)	ABZSO(-)	
Fenbendazol	FBZ	
Sulfóxido de fenbendazol (+)	FBZSO(+)	
Sulfóxido de fenbendazol (-)	FBZSO(-)	
Mebendazol	MBZ	
Nocodazol	NZ	
[5-(fenilsulfamoil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	PCZ1	
{5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	PCZ2	

{5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	PCZ3	
{5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	PCZ4	
{5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	PCZ5	
{5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	PCZ6	
1 <i>H</i> -bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo	CBZ o 2	
[5-(clorosulfonil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	3	
Ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-sulfónico	3a	

ANEXO II. SÍNTESIS QUÍMICA

II.1. Metodología experimental

II.1.1. Instrumentación

La síntesis de los compuestos se realizó en el laboratorio 122, Edificio E de la Facultad de Química de la UNAM.

El peso de las sustancias se determinó empleando una balanza analítica Sartorius AA210P, o bien, en una balanza granataria Scientech SL 600.

Las reacciones a temperatura constante se llevaron a cabo en una parrilla IKA RET básica con sensor de temperatura modelo IKA ETS-D4 fuzzy.

El avance de las reacciones y pureza de los compuestos sintetizados se analizó por cromatografía en capa fina (ccf) empleando cromatoplasmas (Merck) recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor; la composición del Sistema de elución I fue de CHCl₃:MeOH (95:5) con una gota de NH₄OH. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz ultravioleta.

Los puntos de fusión (pf) se determinaron en un equipo Büchi Modelo B-540, utilizando capilares de vidrio y no están corregidos.

En las técnicas espectroscópicas para la identificación de los compuestos se emplearon equipos de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono (RMN ¹H y RMN ¹³C) se adquirieron en un espectrómetro de RMN de 9.4 T marca Varian Modelo VNMRS de 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) relativos al tetrametilsilano (Me₄Si, $\delta=0$) en DMSO-*d*₆, y los valores de *J* en Hz.

Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro de UV/Visible modelo lambda 2, Perkin Elmer. La frecuencia de las señales se reporta en cm⁻¹.

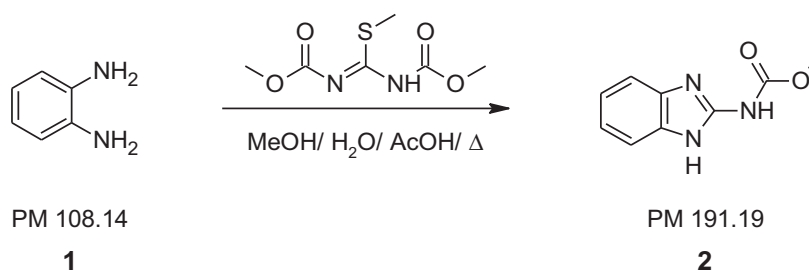
La técnica de análisis elemental se realizó empleando el Analizador Elemental Perkin Elmer 2400 para determinar a los elementos C, H, N y S. El resultado final es un porcentaje relativo de cada elemento (CHNS) presente en la muestra.

La espectrometría de masas se realizó en el equipo The MStation JMS-700 del Instituto de Química de la UNAM, utilizando las técnicas de introducción directa (ID) e ionización por electroespray (ESI+, por sus siglas en inglés). Simbología utilizada: M⁺= ion molecular, m/z = relación masa/carga y pb= pico base.

II.1.2. Reactivos, disolventes y procedimientos generales

La serie de compuestos PCZ se sintetizaron a partir de los reactivos comerciales (Aldrich®): *o*-fenilendiamina y las anilinas adecuadamente sustituidas, algunas de ellas fueron donadas por el laboratorio de Química Farmacéutica, Facultad de Química, UNAM. A continuación, se presentan los procedimientos sintéticos detallados.

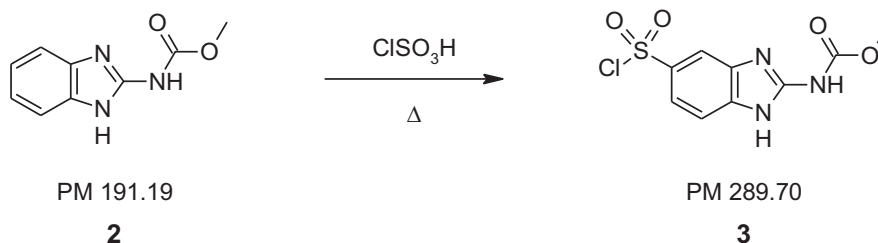
II.1.2.1. Ciclocondensación: 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (2)



Como primer paso se realizó la ciclocondensación de 10 g (0.09247 mol) *o*-fenilendiamina (**1**) en un matraz bola de 250 mL adaptado con un refrigerante en posición de reflujo, conectado a trampas de cloro y agitación magnética. Se adicionaron 28.6 g (0.13871 mol, 1.5 eq) de *N,N'*-dicarboximetoxi-*S*-metilisotiourea, 15 mL de agua, 45 mL de MeOH y 3 mL de ácido acético glacial como catalizador ácido. La mezcla se calentó a 60 °C hasta agotarse la materia prima en aproximadamente 5 h. El producto obtenido se separó por filtración al vacío, se realizaron dos lavados con agua. La purificación se realizó mediante tres lavados con MeOH (15 mL) y

se secó al vacío.¹⁵ Se obtuvo un rendimiento de reacción de 98.0%; el carbamato bencimidazólico, sólido blanco, mostró solo una mancha en ccf de Rf= 0.22 (Sistema I).

II.1.2.2. SEAr: 5-clorosulfonil-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (3)

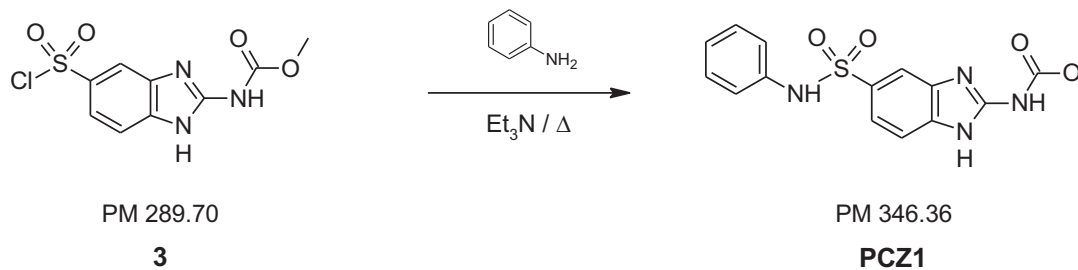


La síntesis del 5-clorosulfonil-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**3**) se realizó a partir del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo (**2**). Se colocó 1 g (5.23 mmol) de **2** en un matraz de bola de dos bocas de 50 mL; se acondicionó con una trampa de NaOH, termómetro, agitación constante y un baño de hielo. A continuación, se adicionó gota a gota 1 mL (3 eq, 0.0157 mol) de ClSO₃H, manteniendo una temperatura aproximada de 0 °C. Al término de la adición, se retiró el baño de hielo y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos; posteriormente, se colocó en calentamiento a 60 °C por 2 h aproximadamente. Al finalizar, se dejó a temperatura ambiente y se procedió a la siguiente reacción inmediatamente.

II.1.2.3. Procedimiento general para la obtención de las sulfonamidas

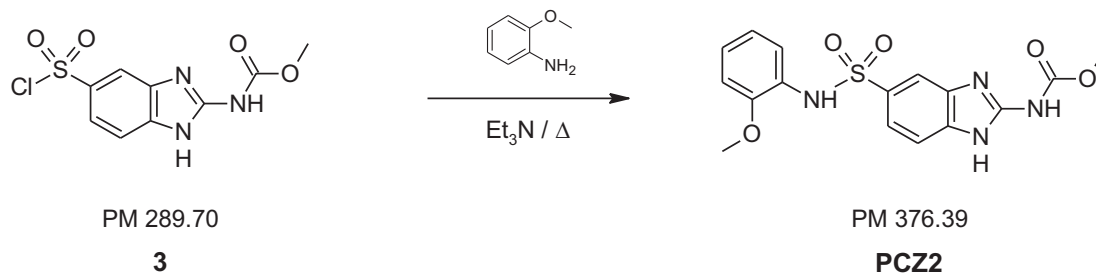
Para la obtención de los productos finales, se asumió 100% de rendimiento de la reacción previa (ver apartado II.1.2.2); la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente, agitación constante y se adicionaron 7 mL de trietilamina (Et₃N, Aldrich®). Posteriormente, se agregaron 3 eq de la anilina adecuada y se calentó a 70 °C durante 4 h. Finalmente, se adicionó una mezcla fría de MeOH-Agua (50:50) y se mantuvo en agitación contante hasta obtener un precipitado, el cual fue filtrado al vacío. Para purificar los productos se realizaron lavados (3 x 5 mL) con MeOH-DMF en una proporción 99:1 y se caracterizaron espectroscópica y espectrométricamente.

II.1.2.4. [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1)



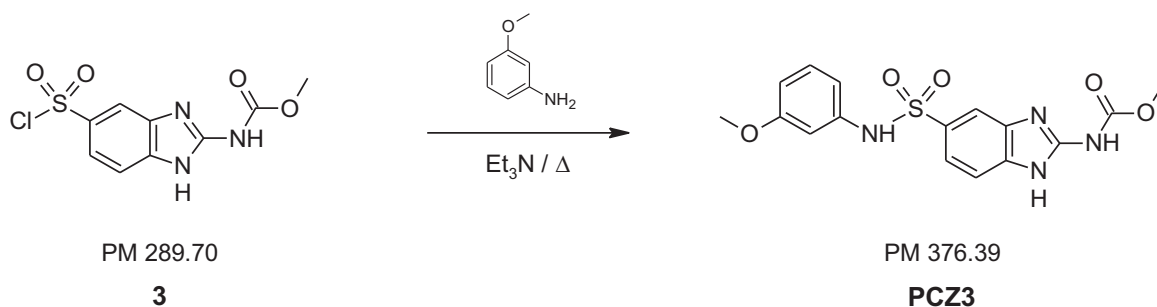
Para la síntesis del producto final **PCZ1** se siguió la metodología **II.1.2.3**; se obtuvo un rendimiento de 46.1%, considerando ésta y la reacción previa. Se obtuvo un sólido blanco que mostró solo una mancha en ccf de Rf= 0.53 (Sistema I).

II.1.2.5. {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2)



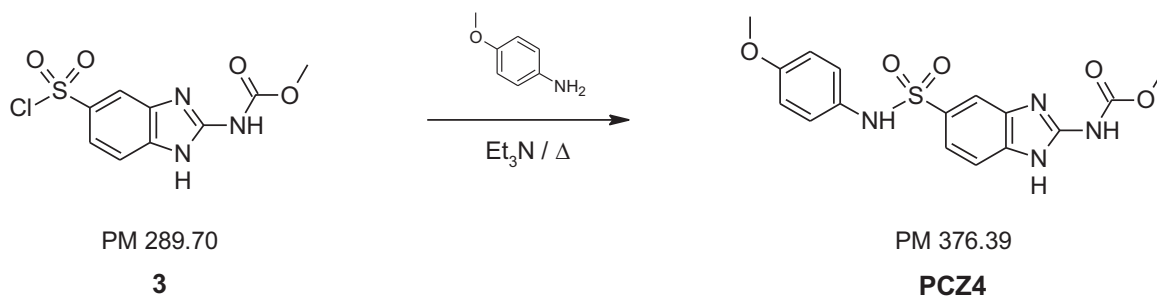
Para la obtención del carbamato bencimidazólico **PCZ2** se empleó la metodología **II.1.2.3**. El rendimiento obtenido fue de 41.8%, considerando ésta y la reacción previa. El producto final, sólido blanco, mostró solo una mancha en ccf de Rf= 0.59 (Sistema I).

II.1.2.6. {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3)



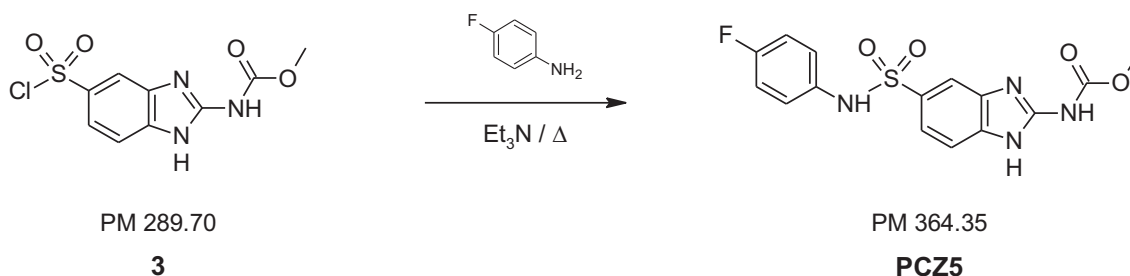
Empleando la metodología **II.1.2.3** se sintetizó el compuesto final **PCZ3**, con un rendimiento de 37.5%, considerando ésta y la reacción previa. El sólido blanco obtenido, presentó una sola mancha en ccf (Rf= 0.57, Sistema I).

II.1.2.7. {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4)



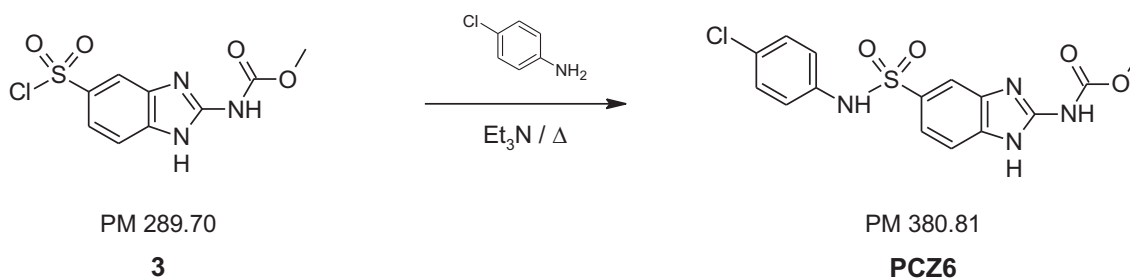
Se utilizó la metodología descrita en el apartado **II.1.2.3** para obtener el carbamato bencimidazólico **PCZ4**; el rendimiento de la reacción esta reacción y la anterior fue de 43.1%. Se obtuvo un sólido blanco, con una sola mancha en cff y Rf= 0.52 en el Sistema de elución I.

II.1.2.8. {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5)



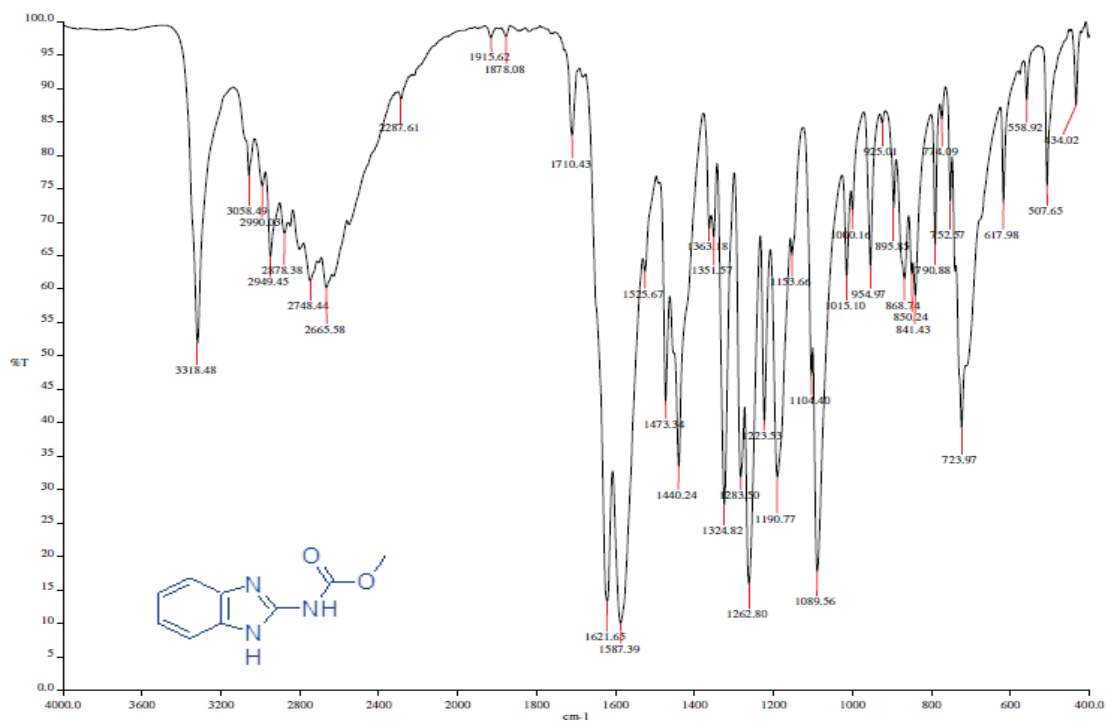
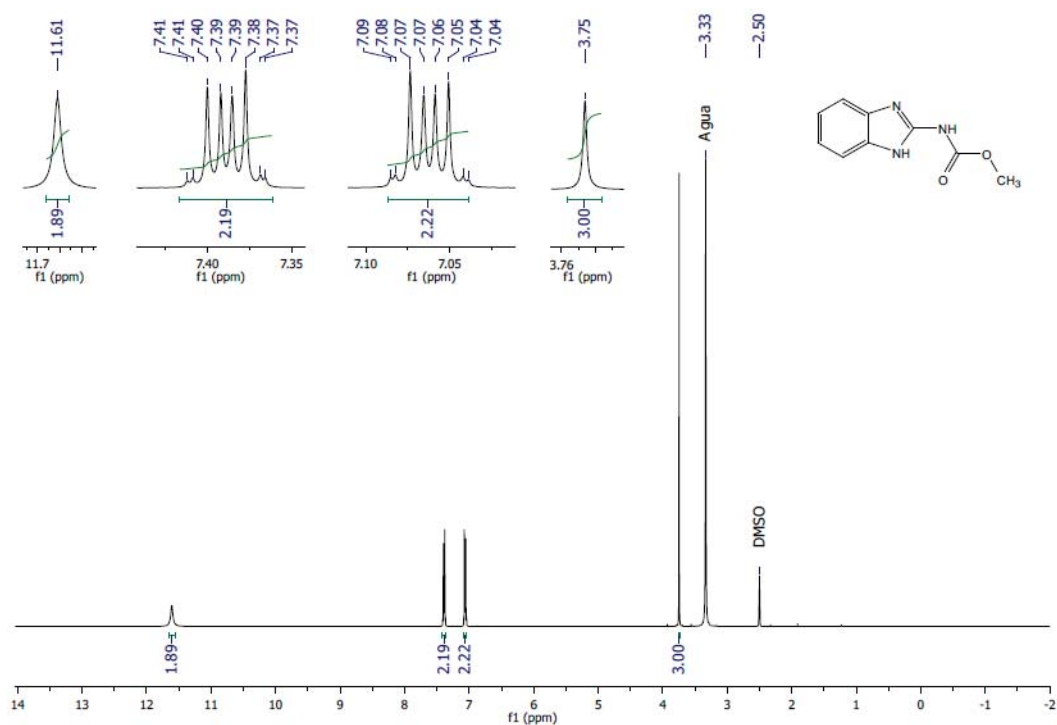
Partiendo del cloruro de sulfonilo **3** y siguiendo la metodología **II.1.2.3**, se obtuvo el producto final **PCZ5** con un rendimiento de 32.7%, considerando ésta y la reacción previa. El sólido blanco obtenido mostró solo una mancha en ccf, $R_f = 0.54$ (Sistema I).

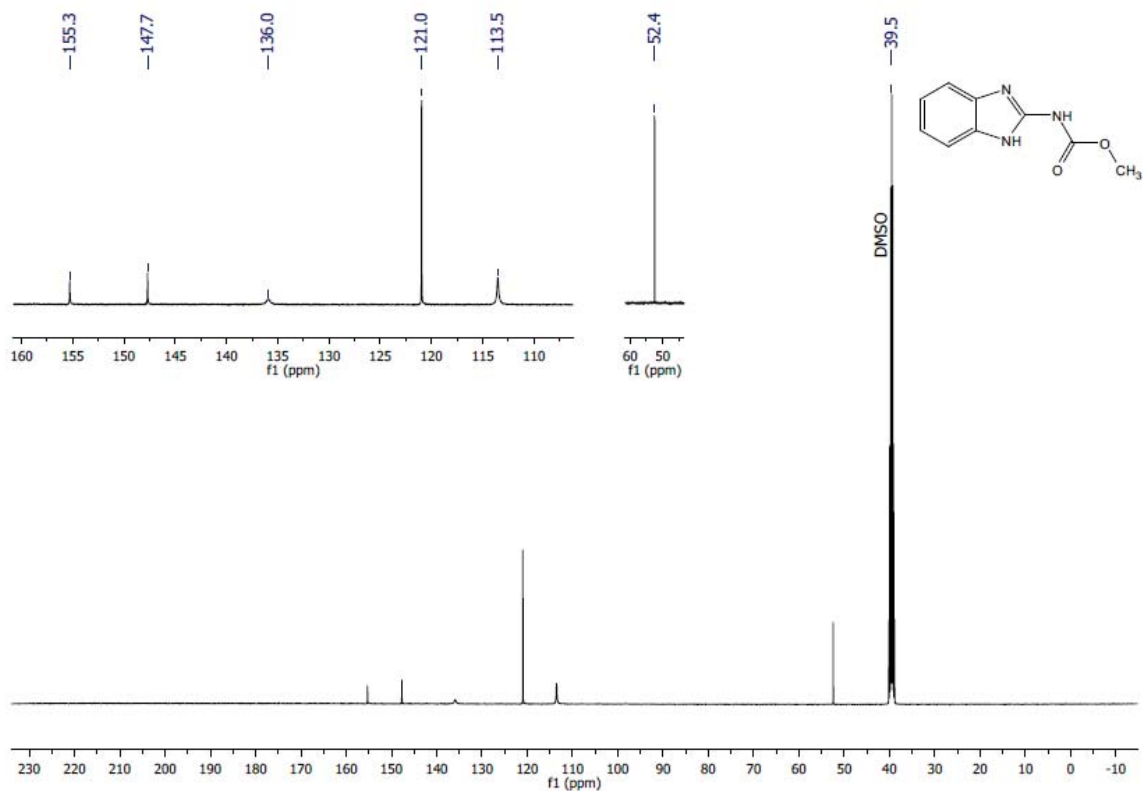
II.1.2.9. {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6)



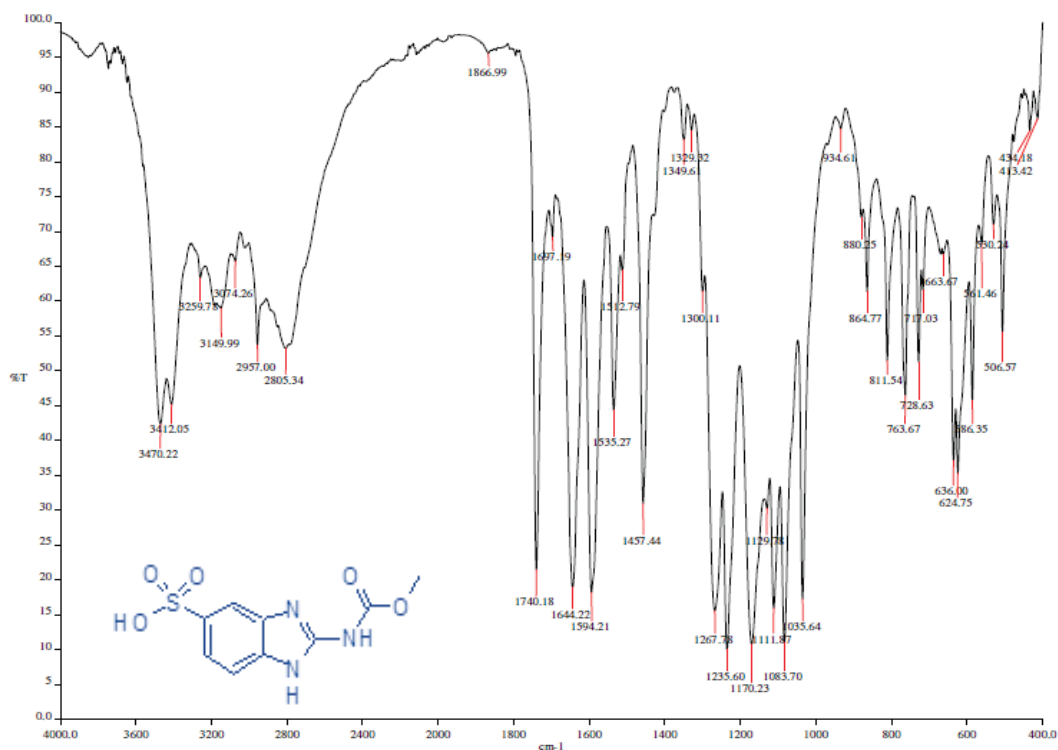
Se empleó la metodología **II.1.2.3** para sintetizar el carbamato bencimidazólico **PCZ6**, el cual se obtuvo con un rendimiento del 27.0%, considerando esta reacción y la anterior. El producto final que se obtuvo, un sólido blanco, mostró solo una mancha en cff y un R_f de 0.58 en el Sistema de elución I.

II.2. Espectros

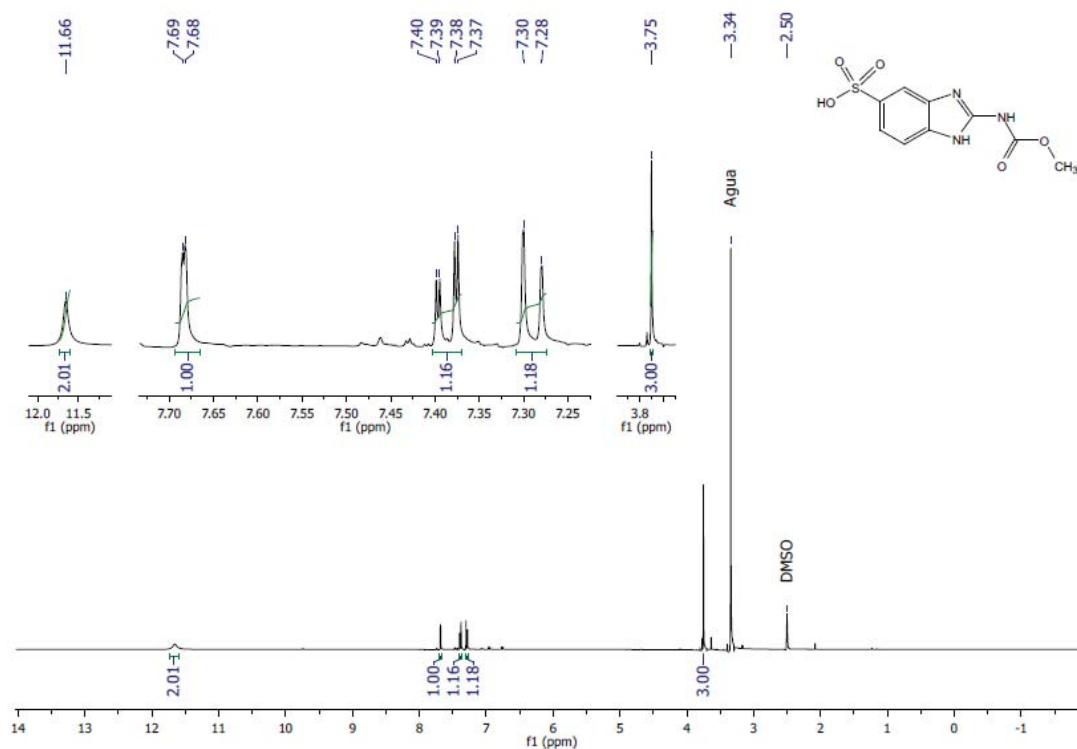
Espectro 1. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto 1H-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo (2).Espectro 2. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto 1H-benzimidazol-2-ilcarbamato de metilo (2).



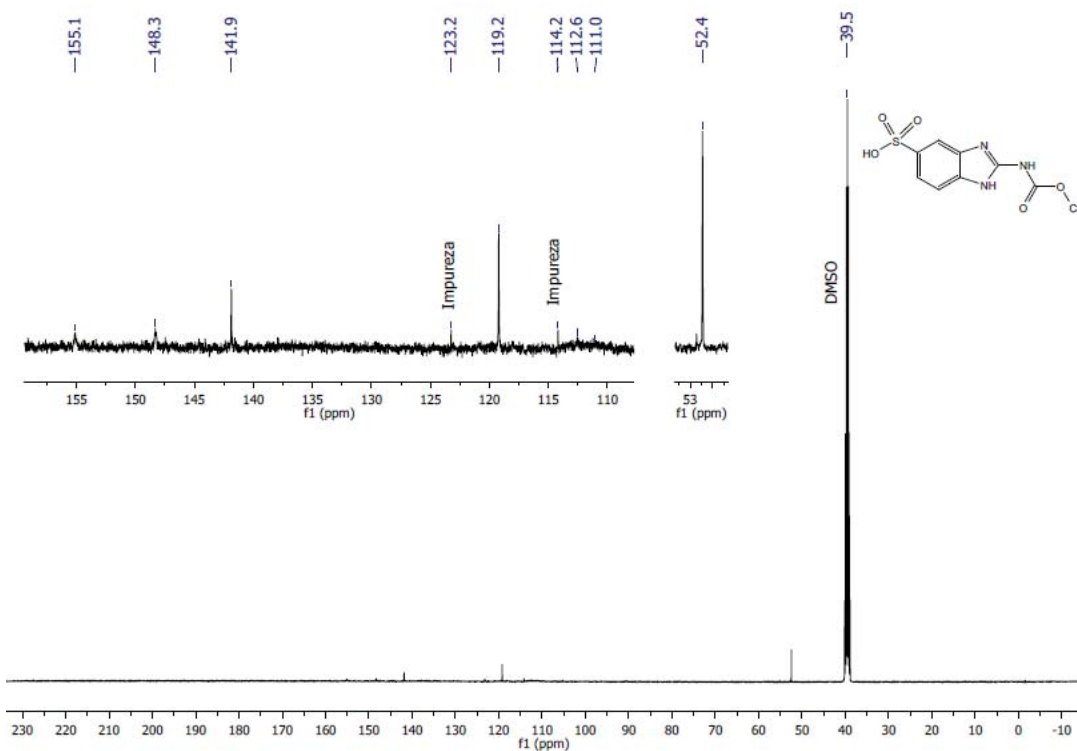
Espectro 3. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto 1H-benzimidazol-2-icarbamato de metilo (2).



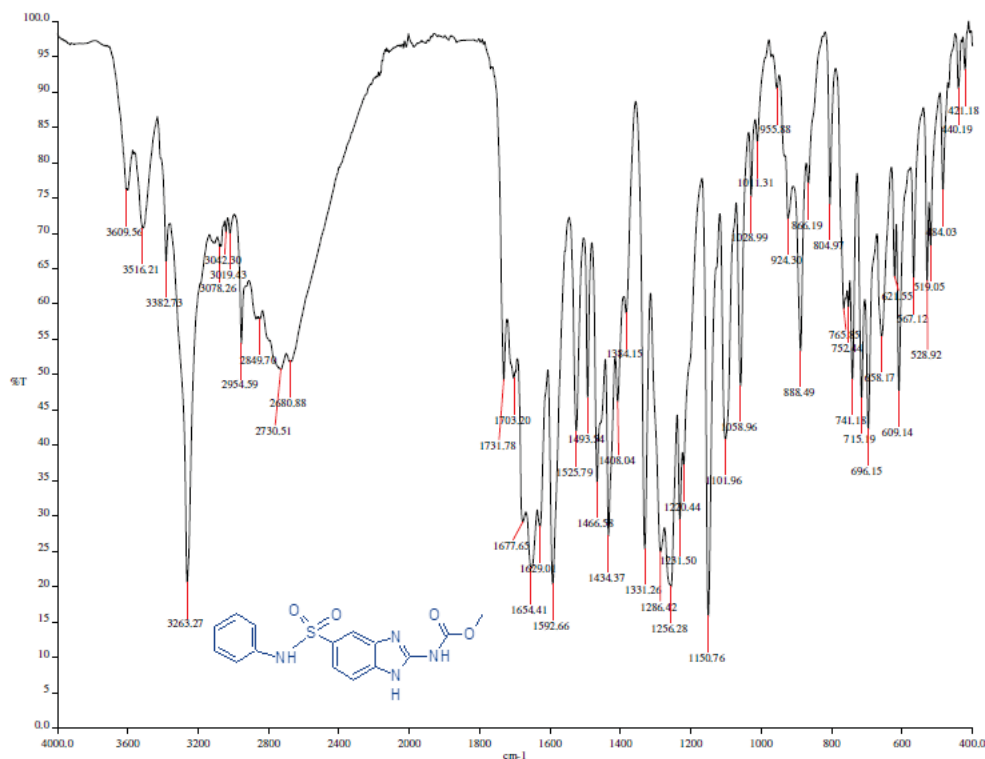
Espectro 4. IR (ATR, cm^{-1}) del compuesto ácido 2-[(metoxicarbonil)amino]-1H-benzimidazol-5-sulfónico (3a).



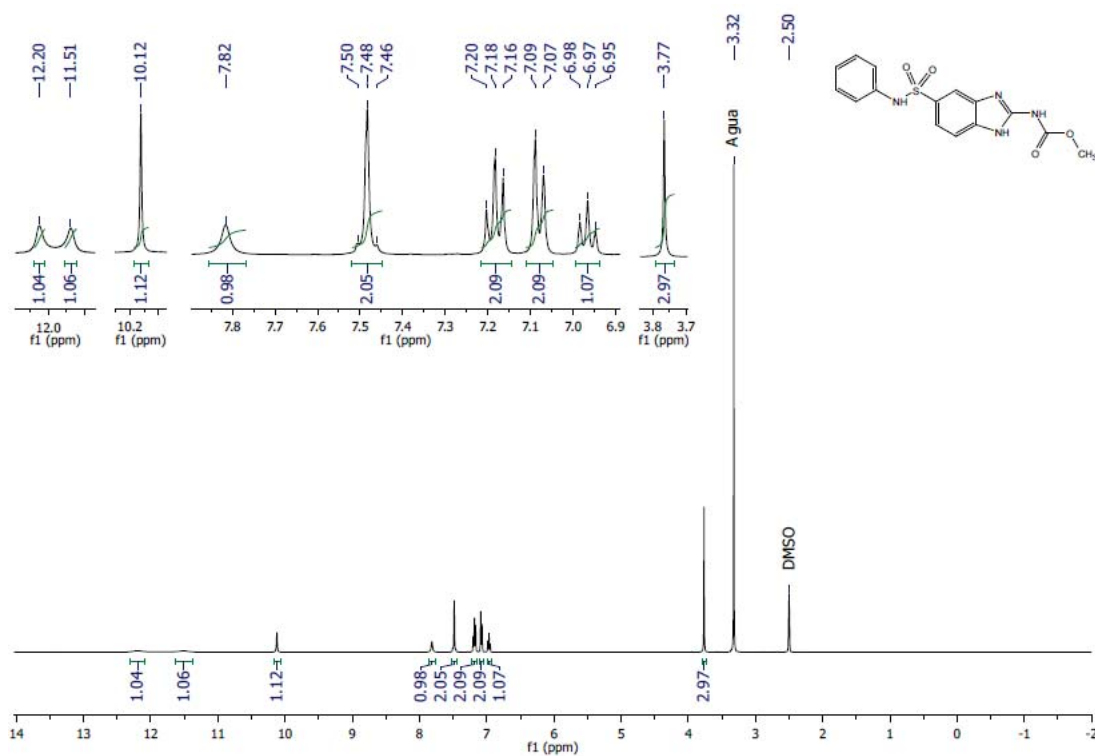
Espectro 5. RMN ^1H (TMS, DMSO- d_6 , 400 MHz, δ en ppm) del compuesto ácido 2-[(metoxycarbonyl)amino]-1H-benzimidazol-5-sulfónico (**3a**).



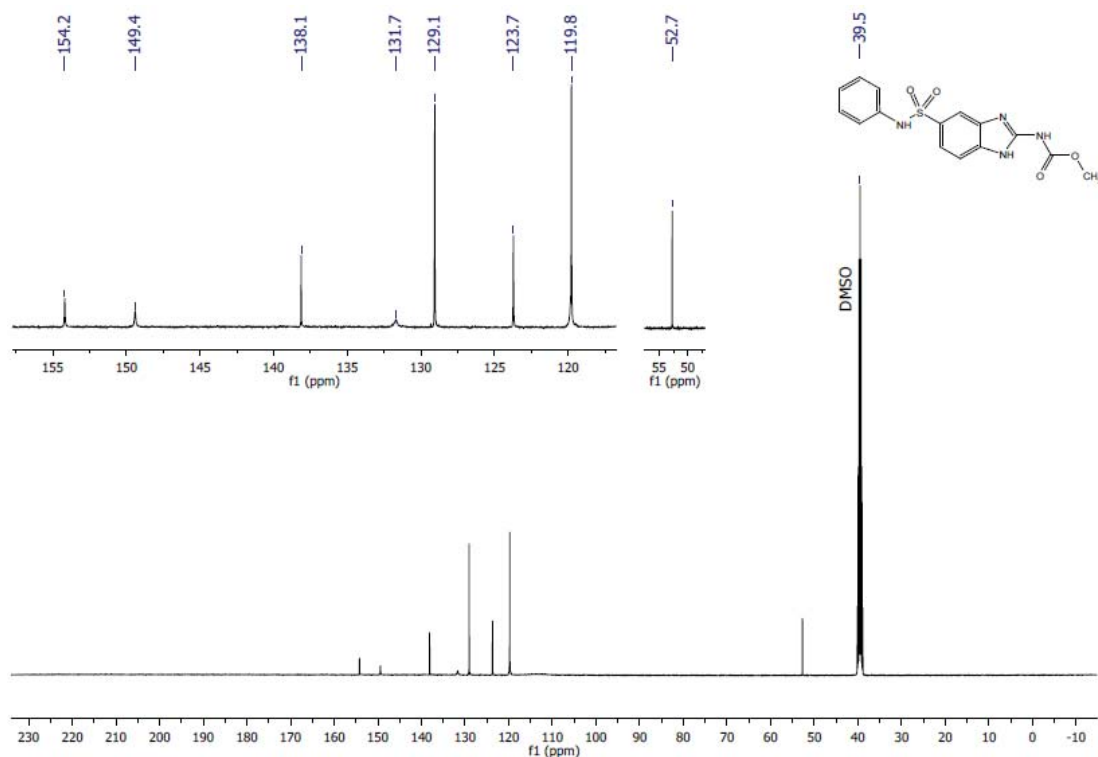
Espectro 6. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto ácido 2-[(metoxycarbonyl)amino]-1H-benzimidazol-5-sulfónico (**3a**).



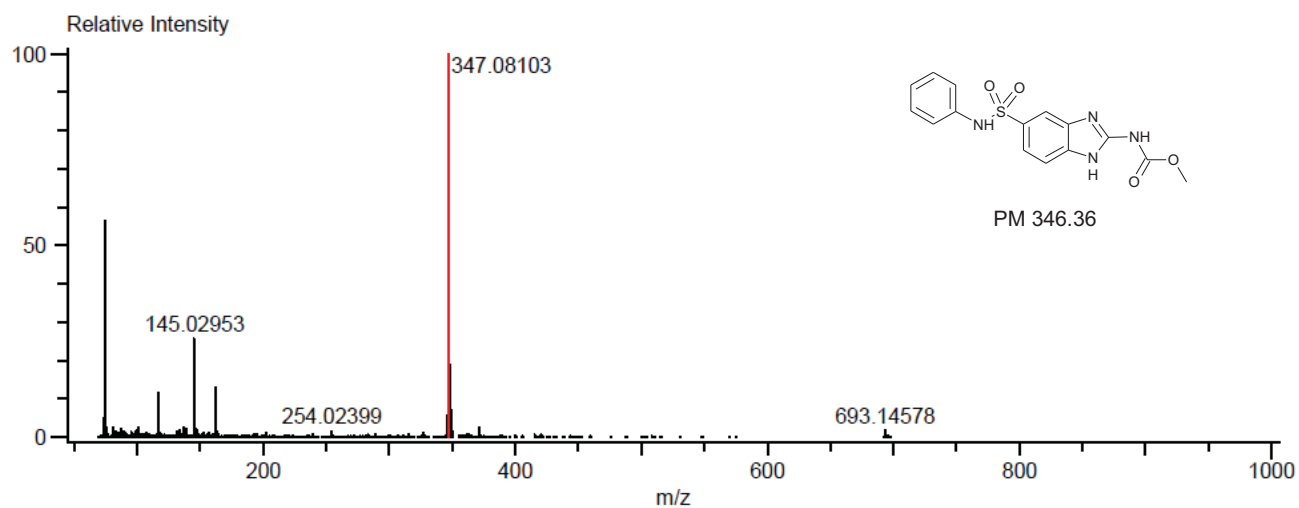
Espectro 7. IR (ATR, cm^{-1}) del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).



Espectro 8. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1H-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).

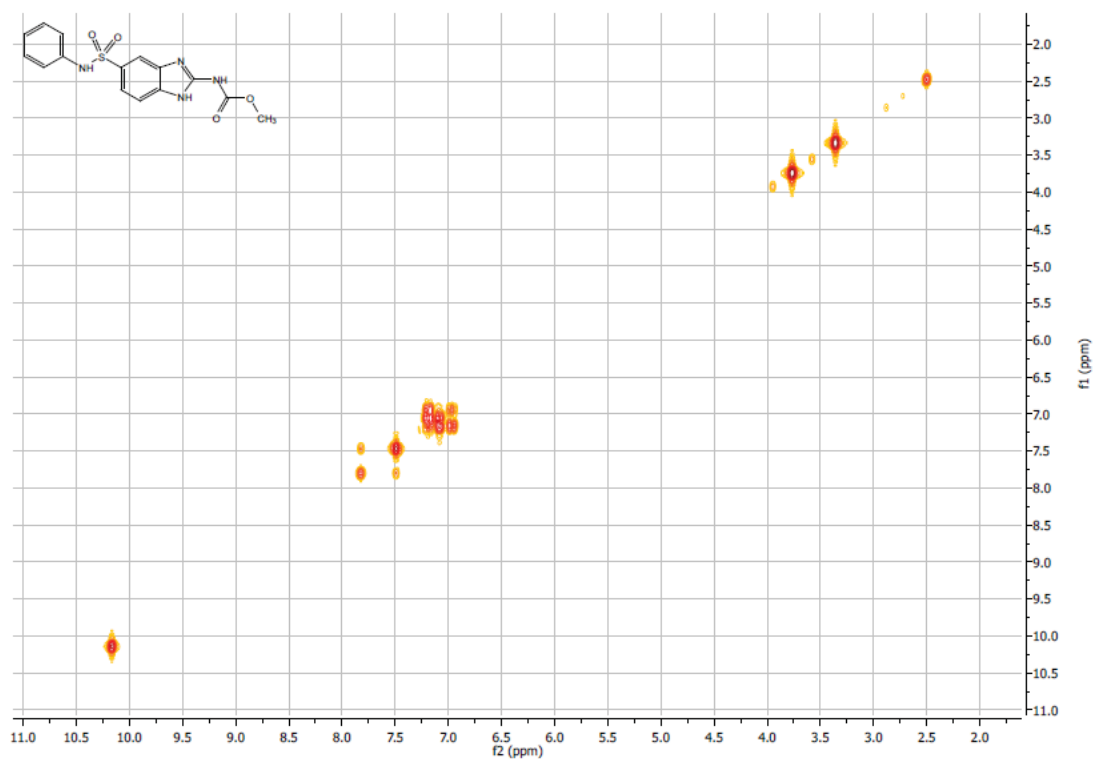


Espectro 9. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**PCZ1**).

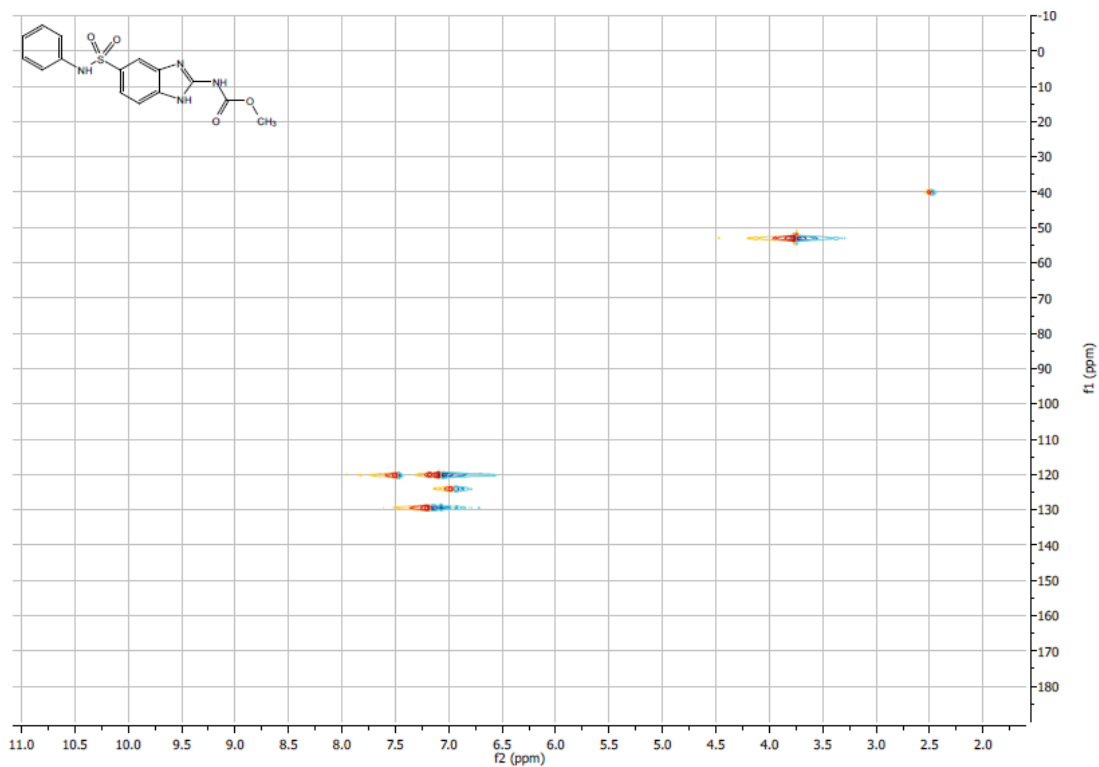


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
347.08103	313213.67	347.08140	-0.37	-1.06	$^{12}\text{C}_{15}^{1}\text{H}_{15}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_4^{32}\text{S}_1$

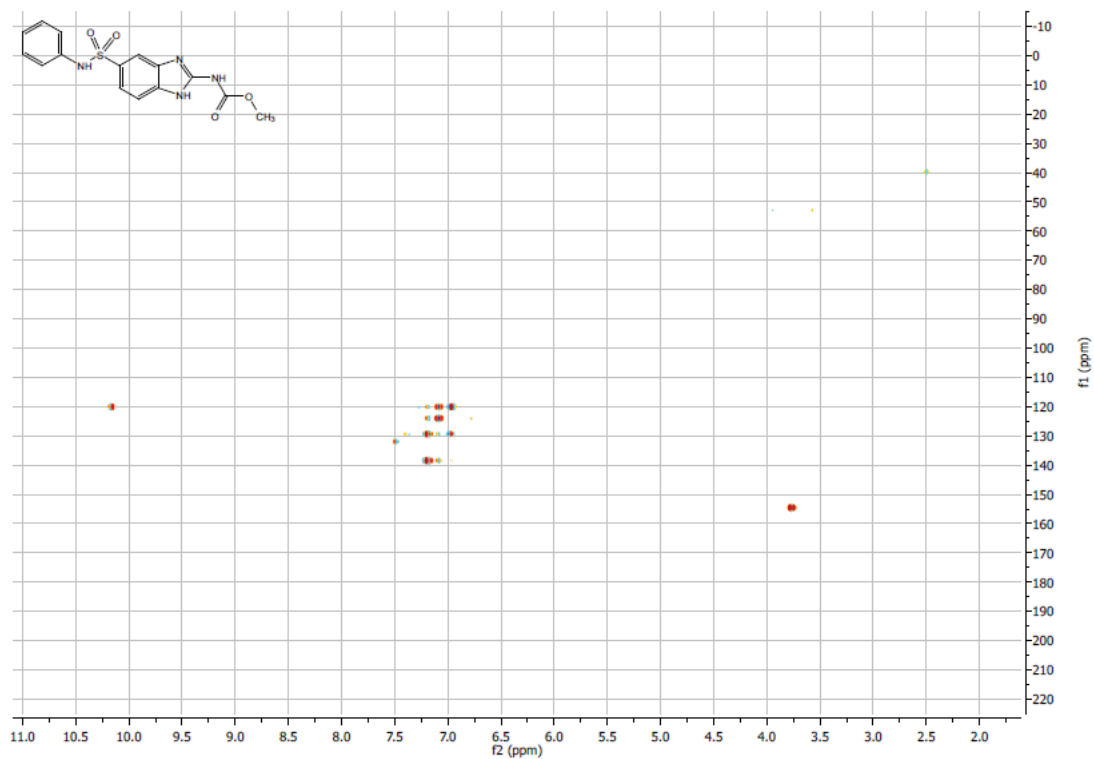
Espectro 10. EM (ESI+, m/z) del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (**PCZ1**).



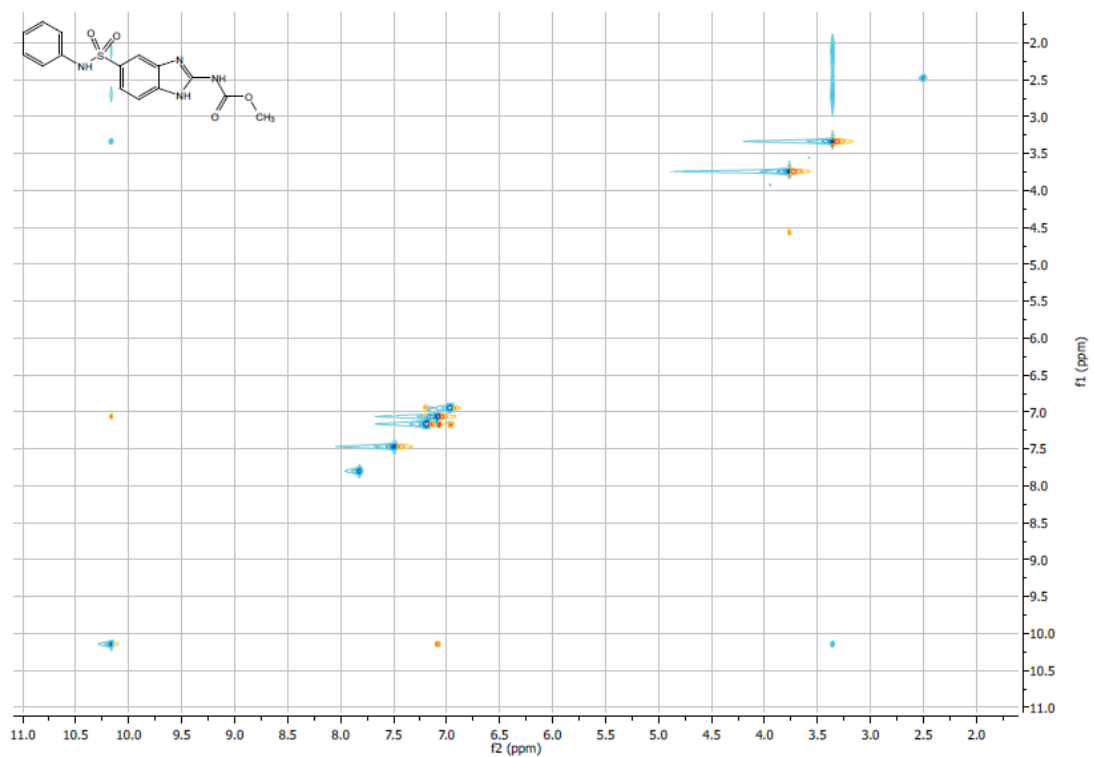
Espectro 11. Experimento COSY del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).



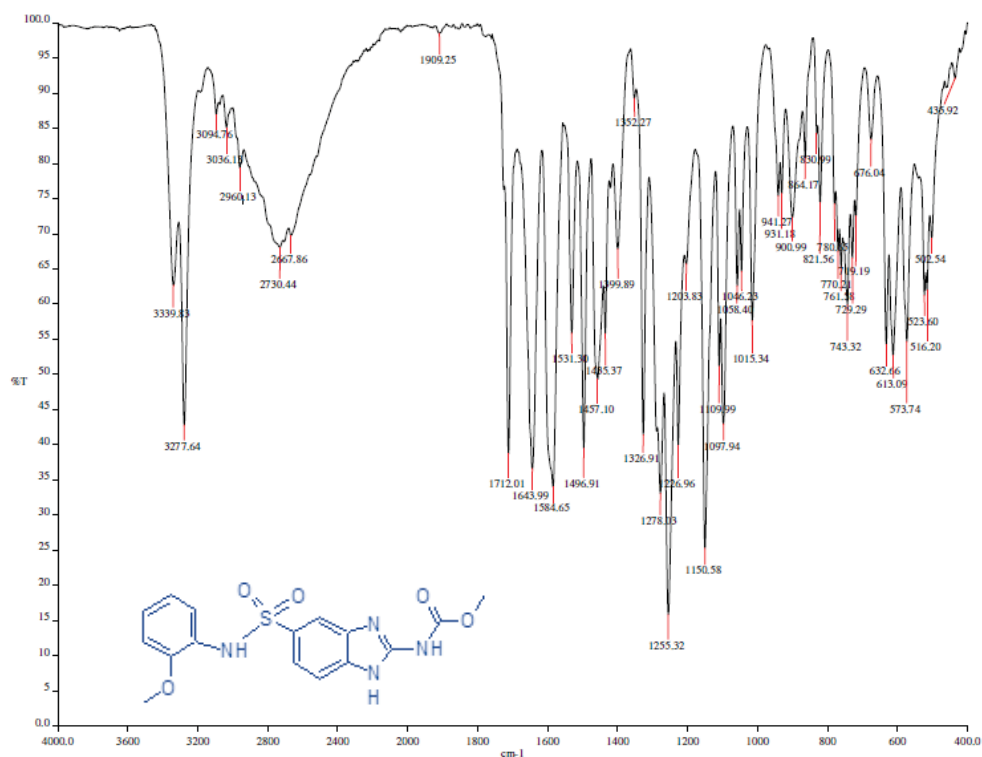
Espectro 12. Experimento HSQC del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).



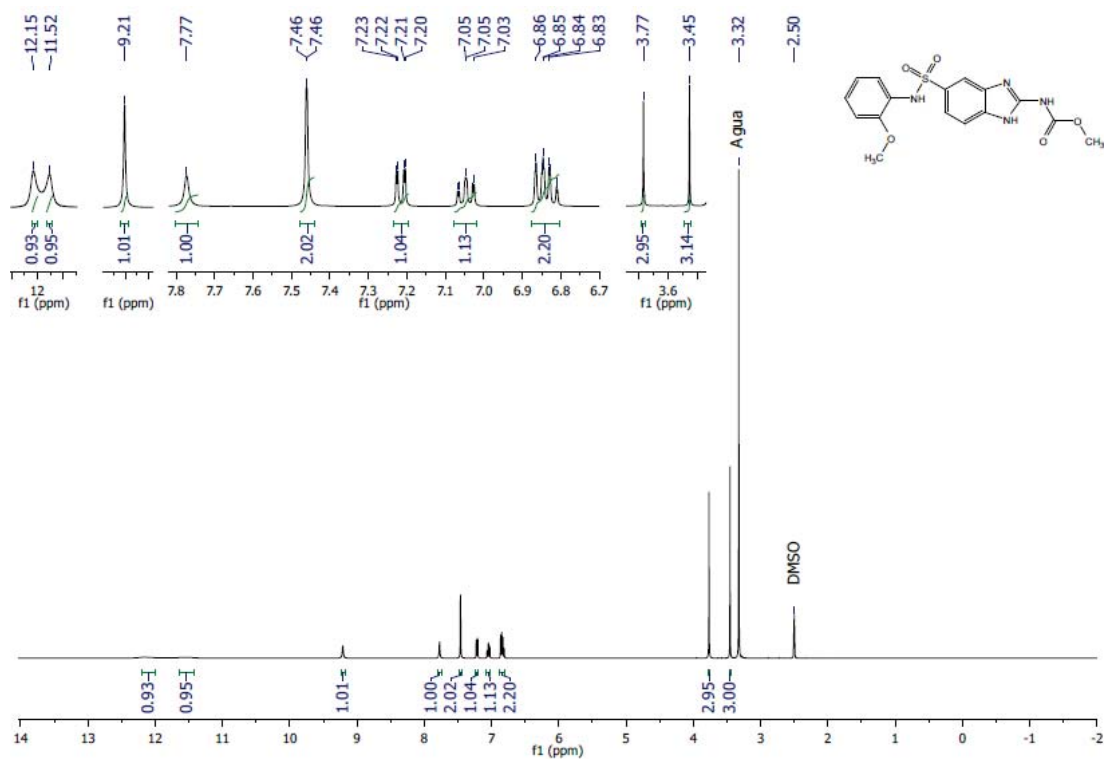
Espectro 13. Experimento HMBC del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).



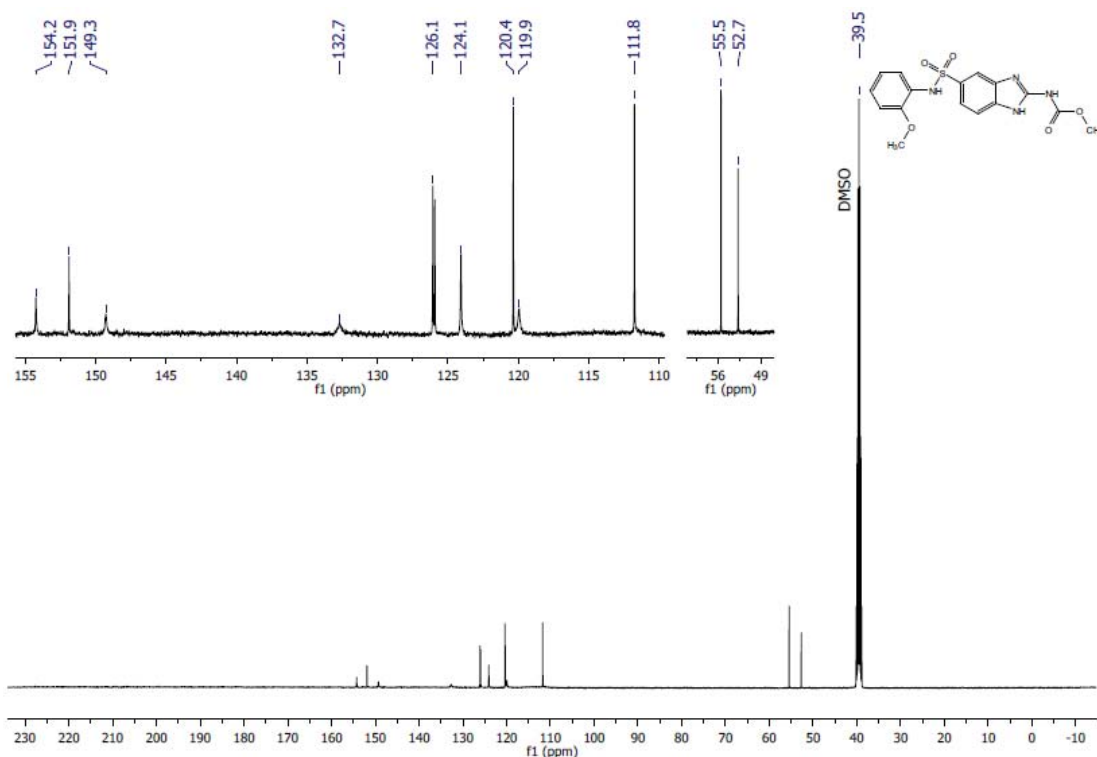
Espectro 14. Experimento NOESY del compuesto [5-(fenilsulfamoil)-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ1).



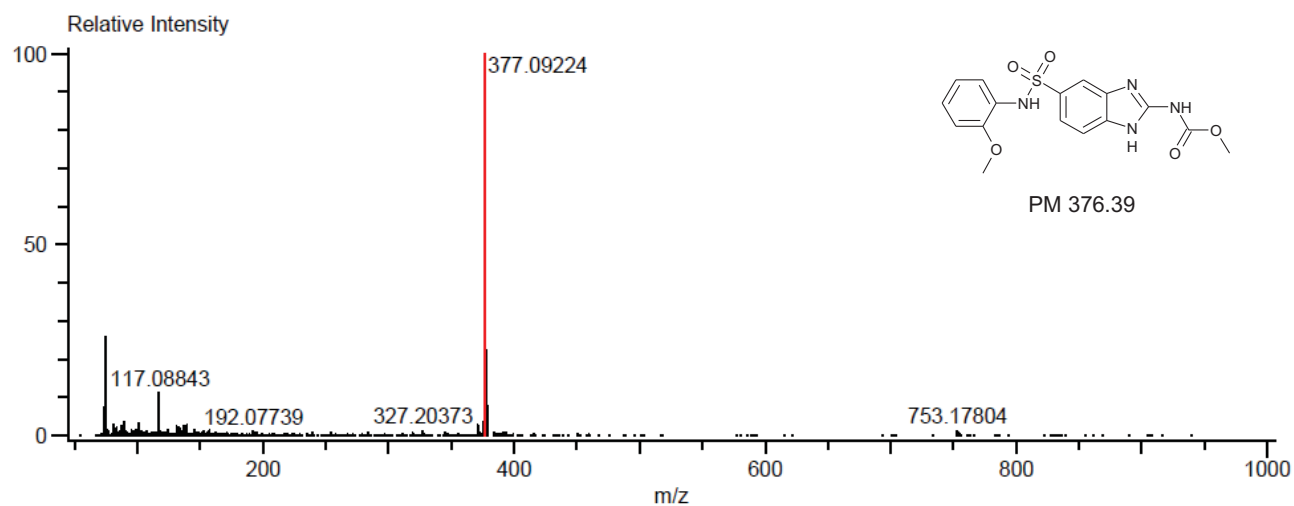
Espectro 15. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoi]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



Espectro 16. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoi]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).

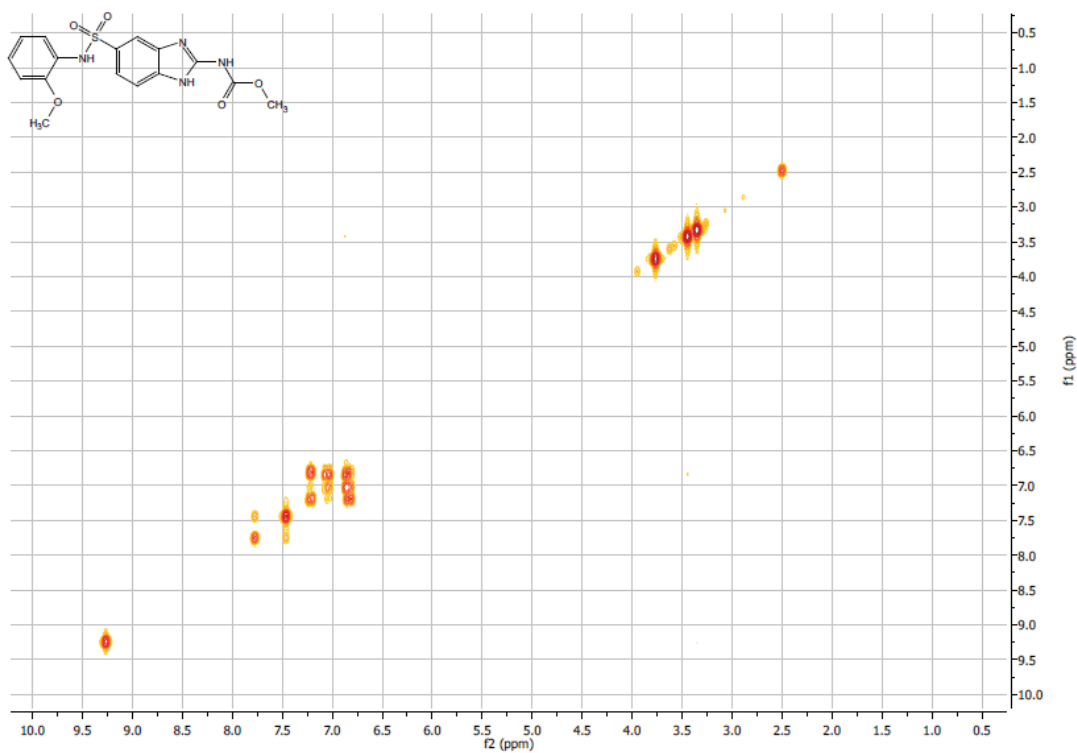


Espectro 17. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).

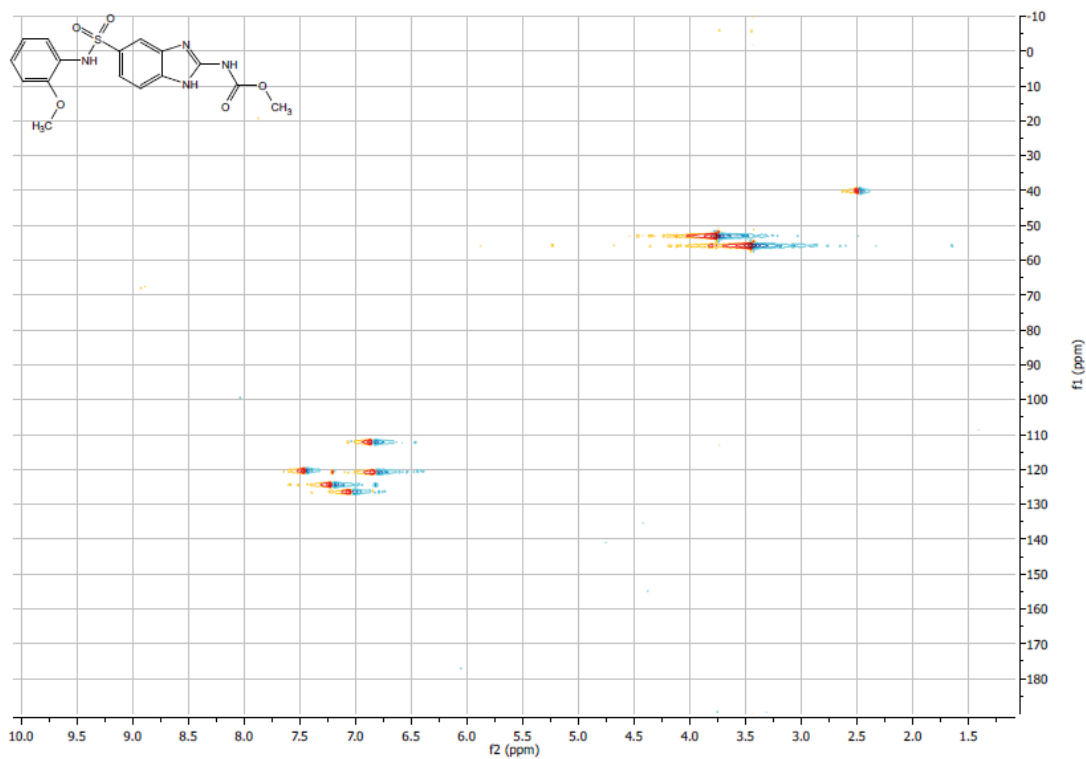


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
377.09224	152074.75	377.09196	0.28	0.74	$^{12}\text{C}_{16}^{1}\text{H}_{17}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$

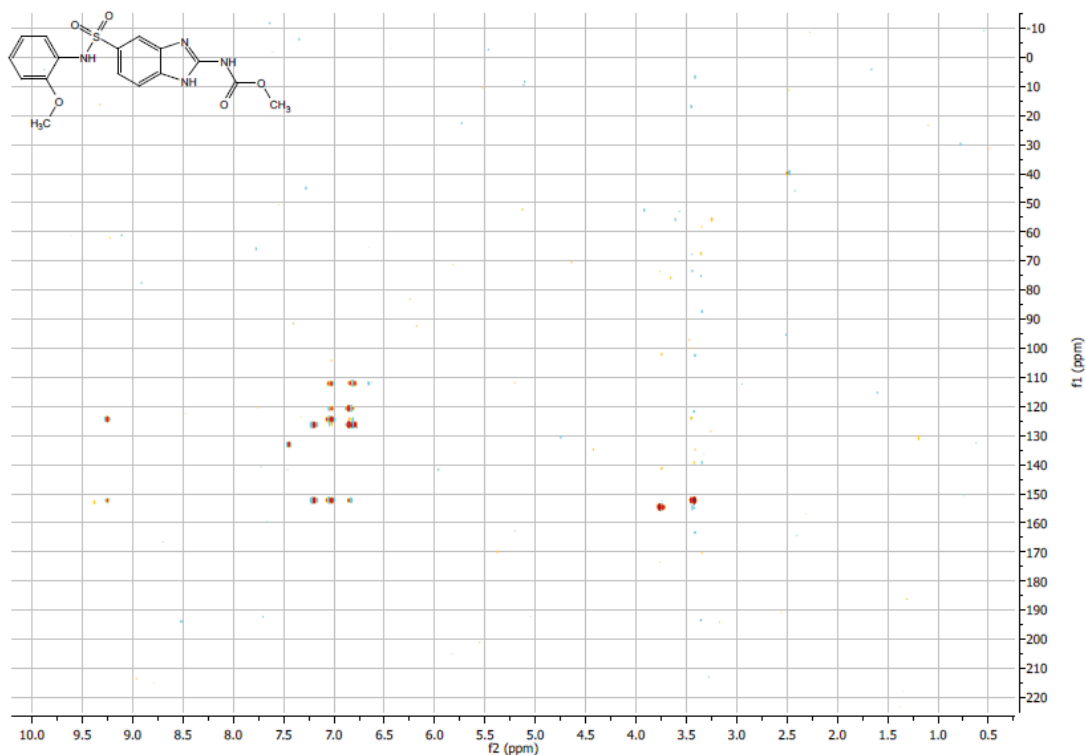
Espectro 18. EM (ESI+, m/z) del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



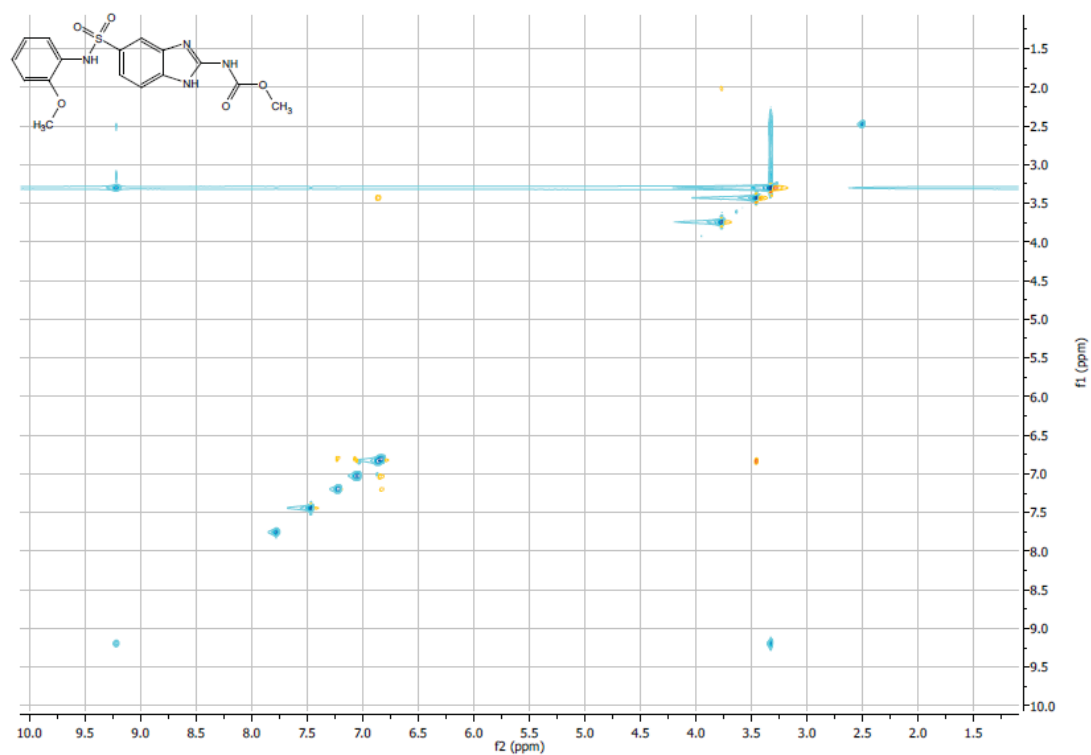
Espectro 19. Experimento COSY del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



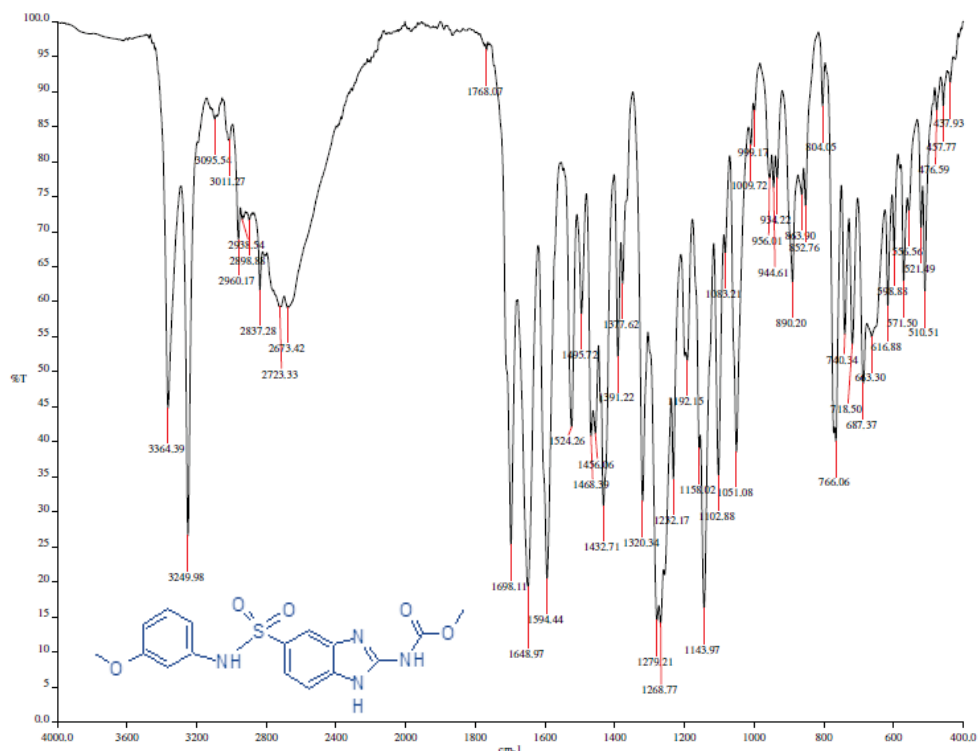
Espectro 20. Experimento HSQC del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



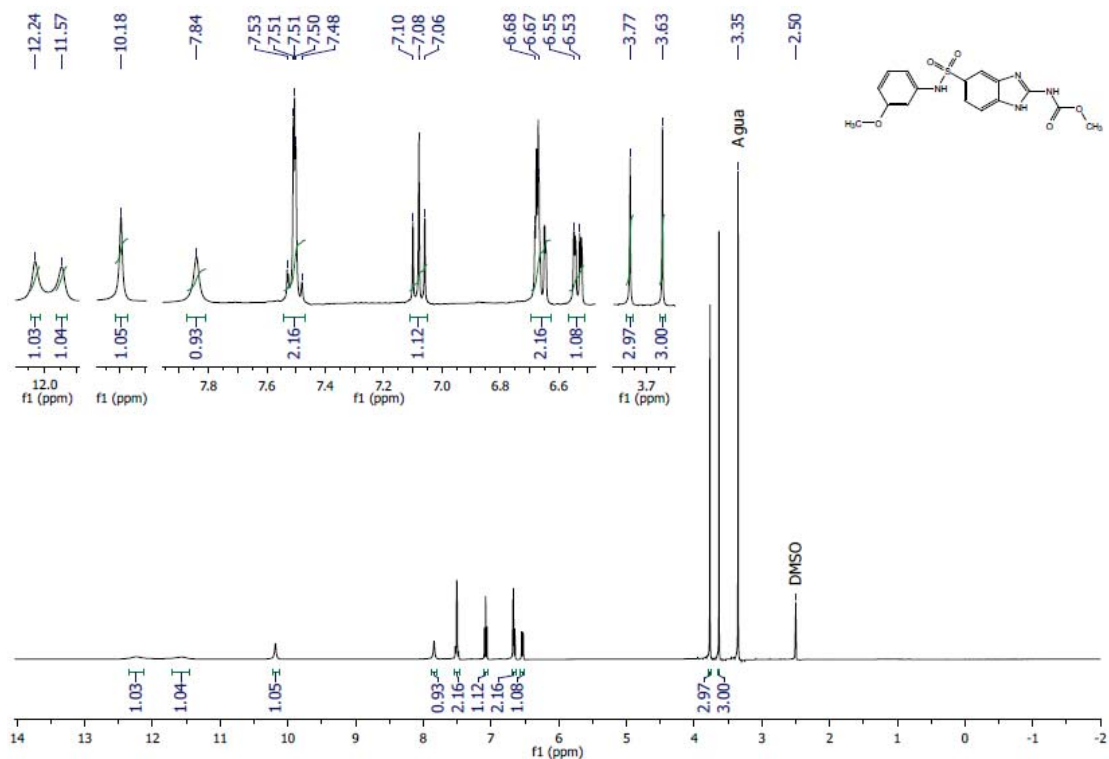
Espectro 21. Experimento HMBC del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



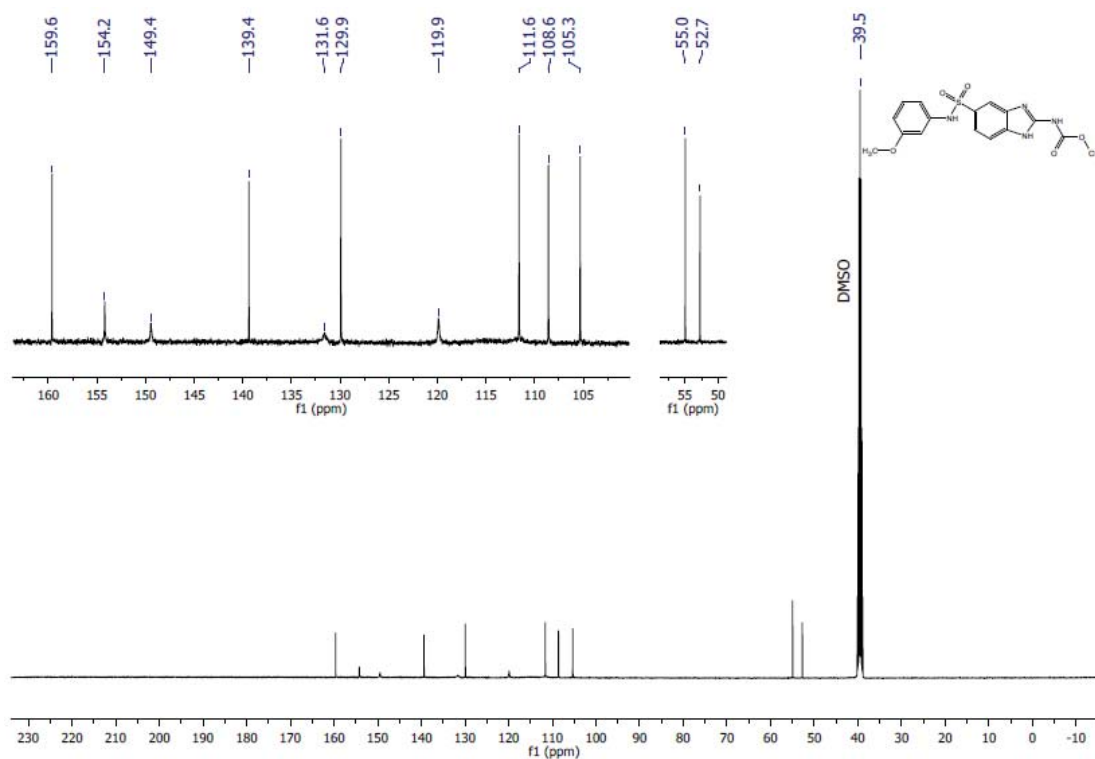
Espectro 22. Experimento NOESY del compuesto {5-[(2-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ2).



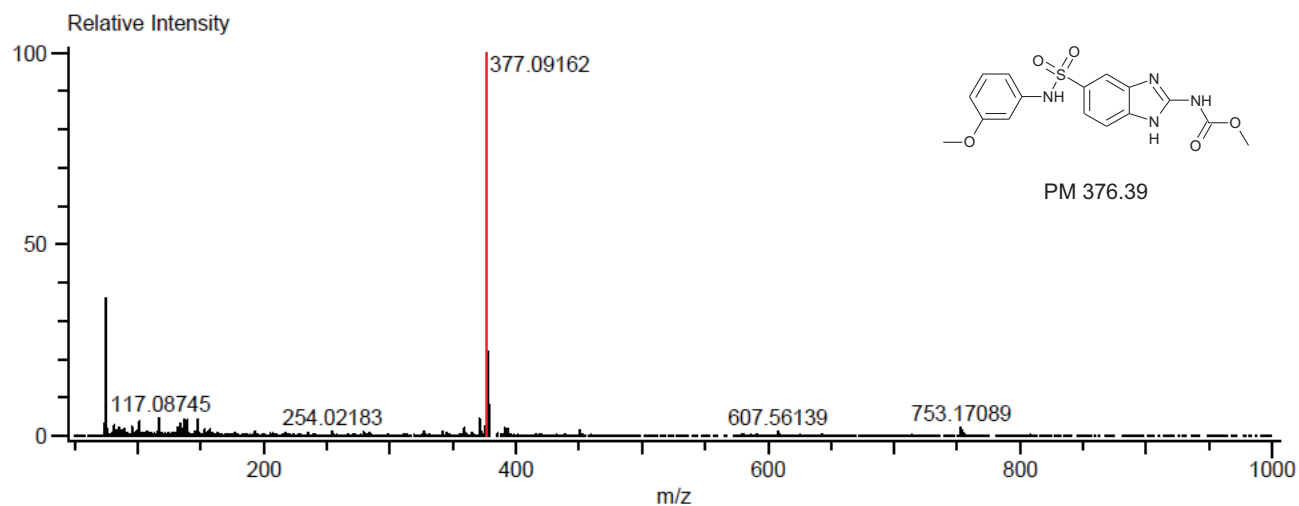
Espectro 23. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).



Espectro 24. RMN ¹H (TMS, DMSO-d₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).

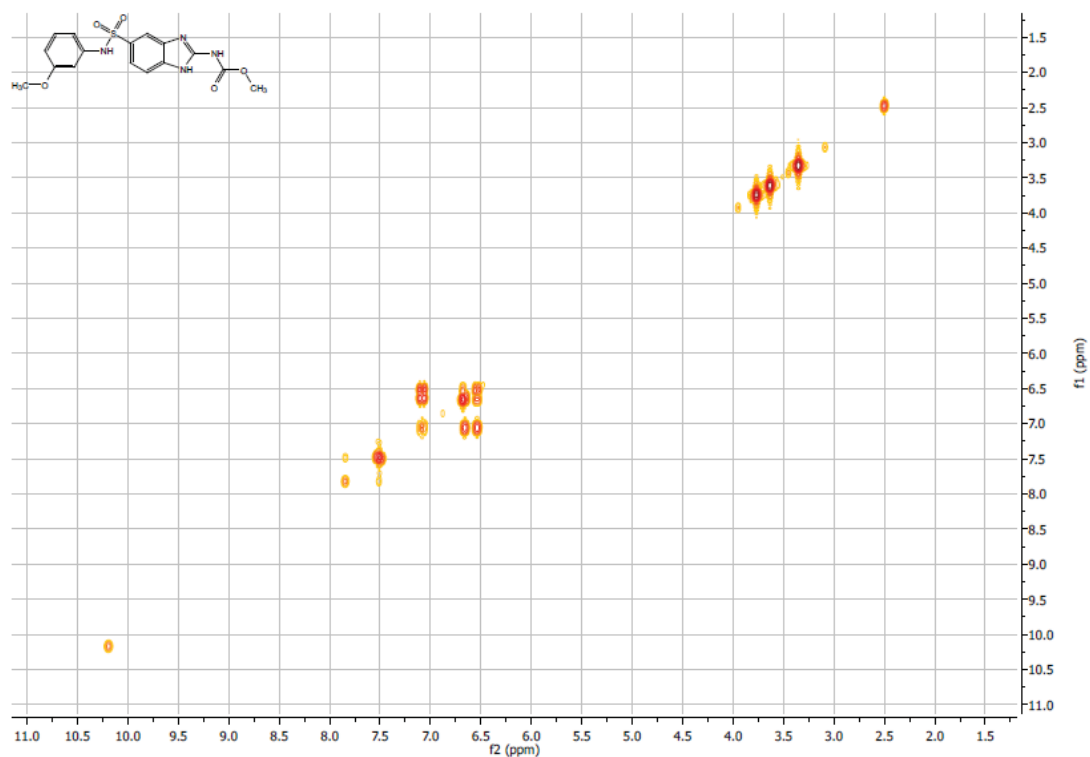


Espectro 25. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ3).

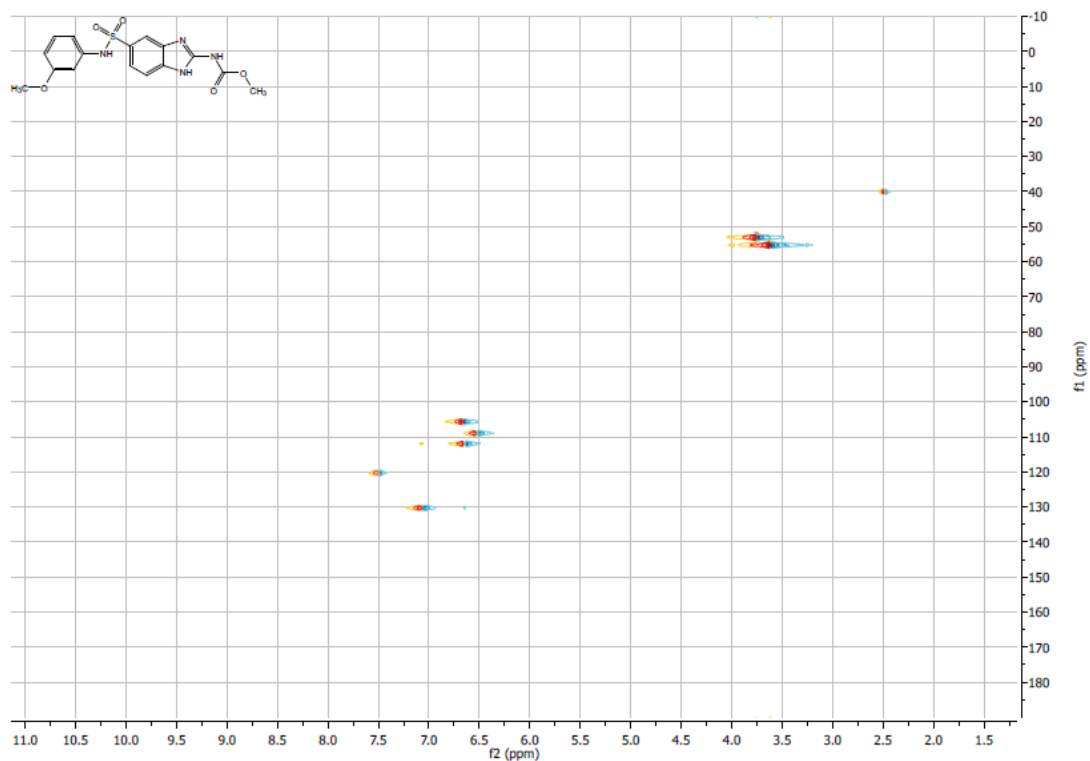


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
377.09162	181000.50	377.09196	-0.35	-0.91	$^{12}\text{C}_{16}^{1}\text{H}_{17}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$

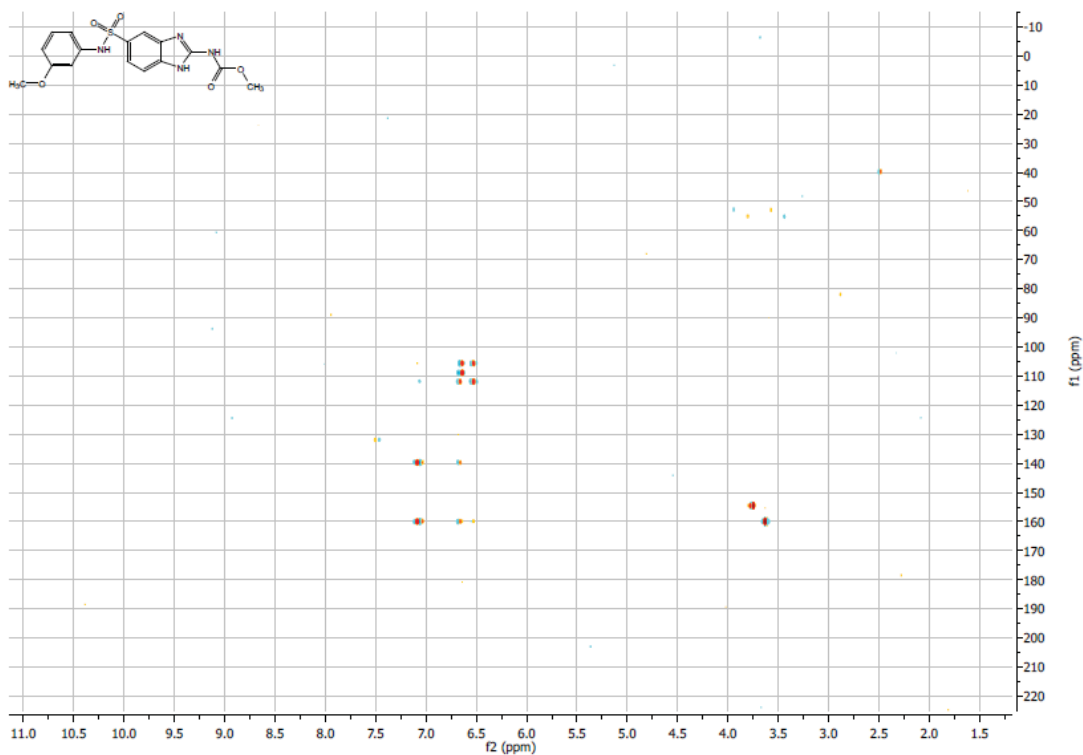
Espectro 26. EM (ESI+, m/z) del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ3).



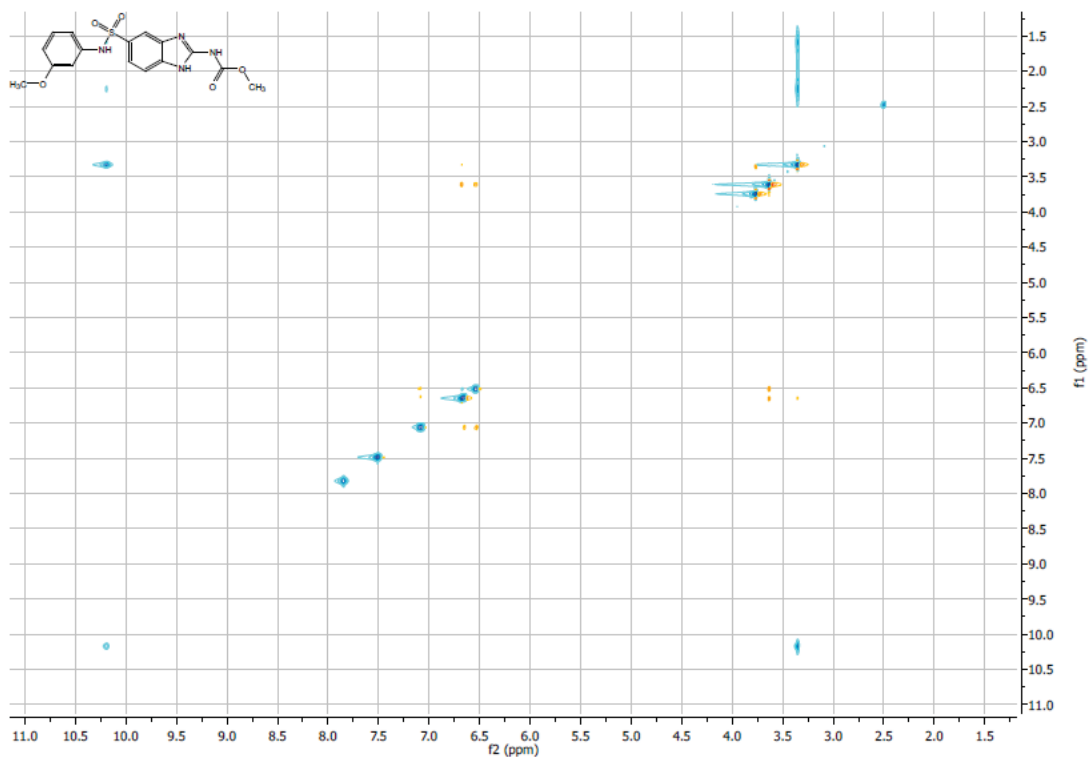
Espectro 27. Experimento COSY del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).



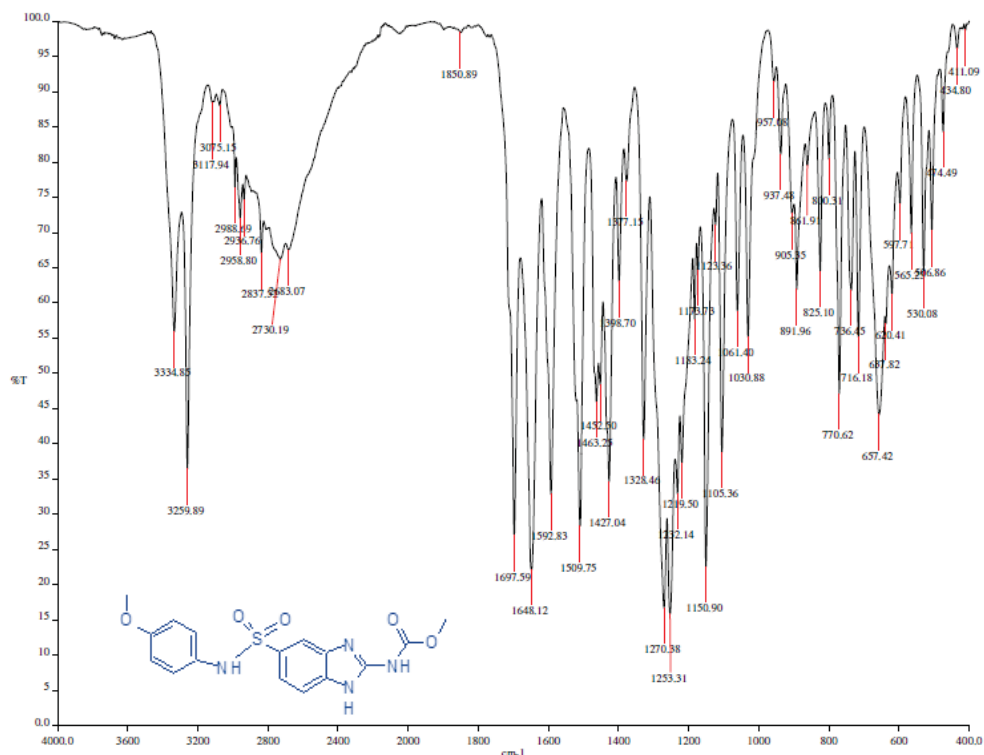
Espectro 28. Experimento HSQC del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).



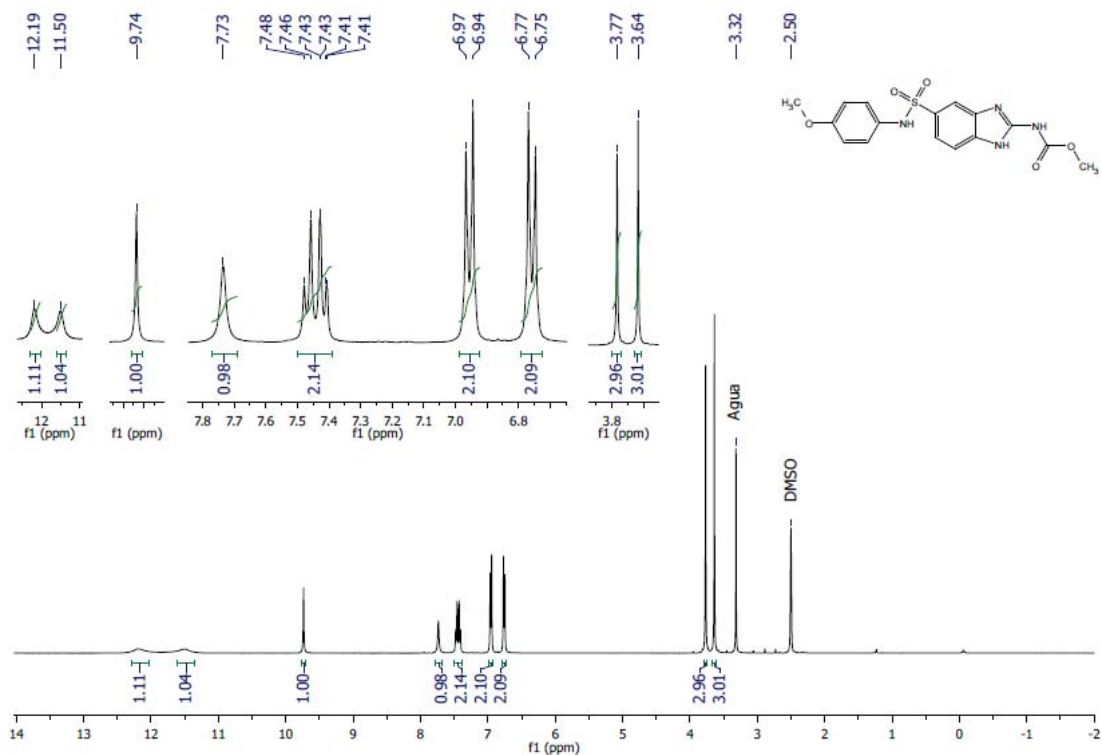
Espectro 29. Experimento HMBC del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).



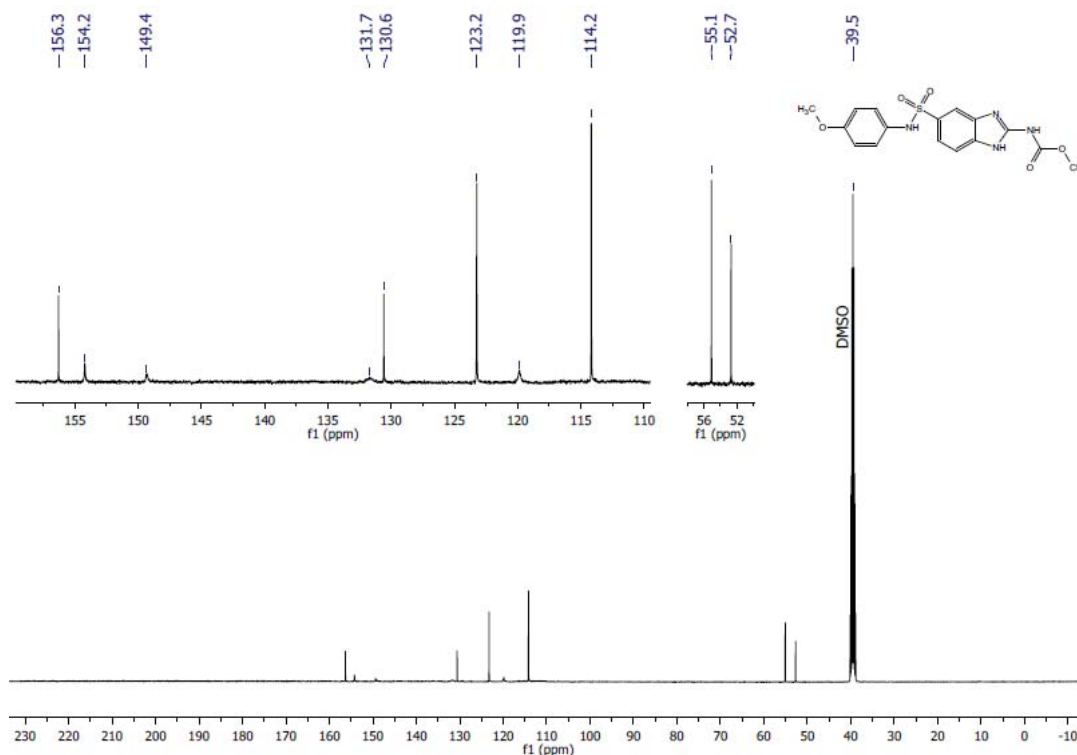
Espectro 30. Experimento NOESY del compuesto {5-[(3-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ3).



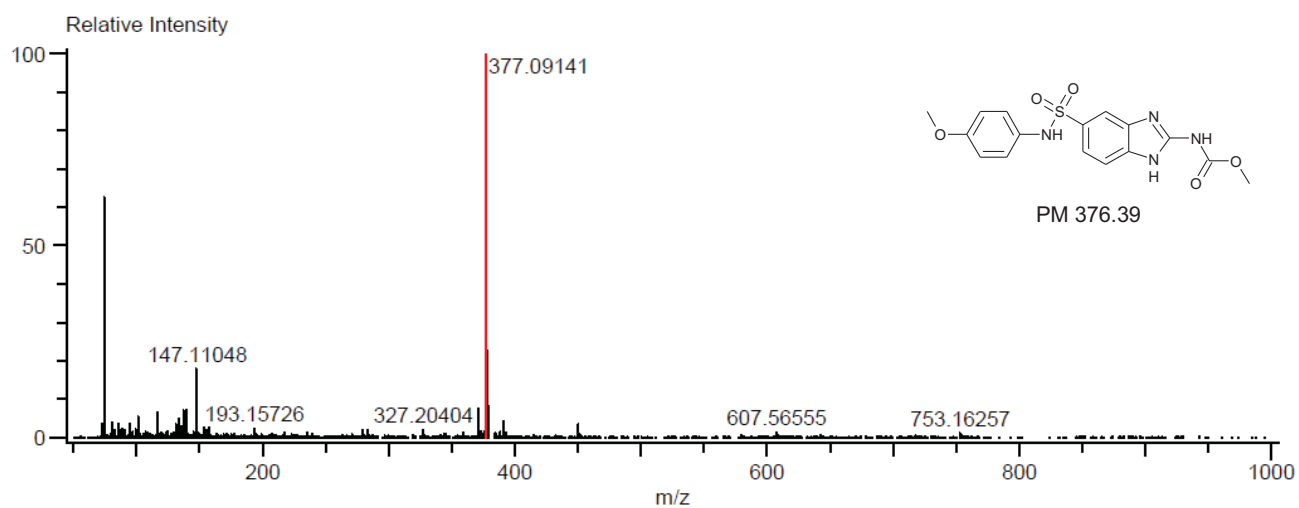
Espectro 31. IR (ATR, cm^{-1}) del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoi]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).



Espectro 32. RMN ^1H (TMS, $\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoi]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).

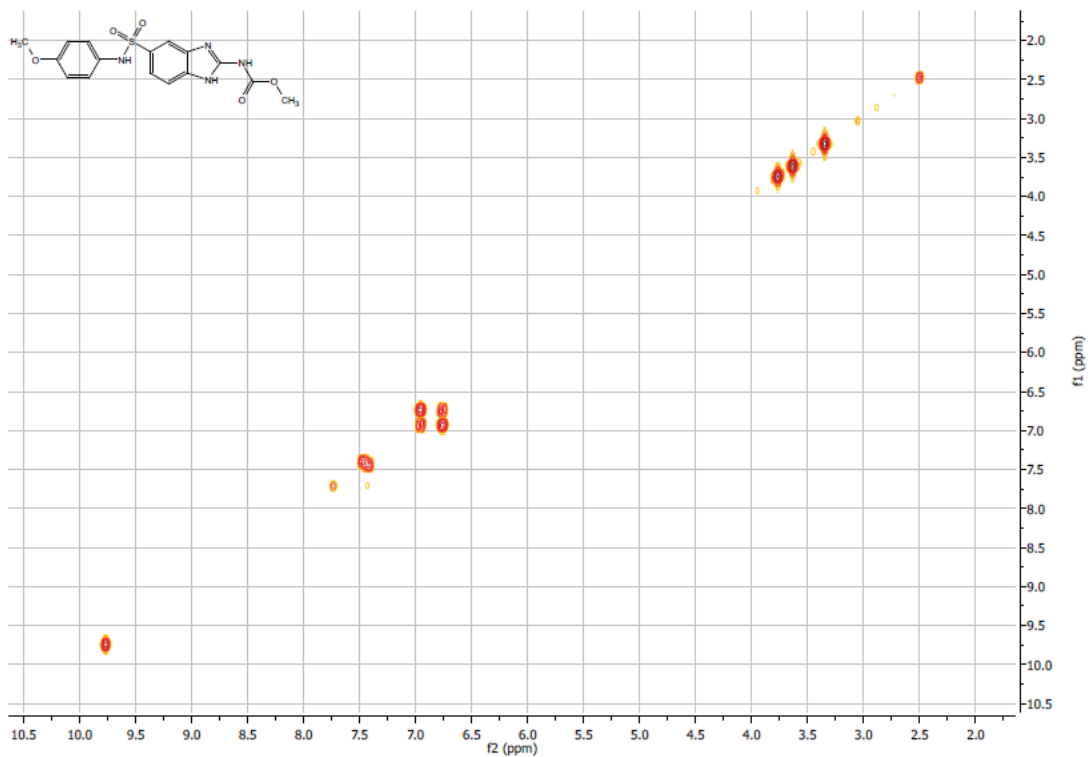


Espectro 33. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**PCZ4**).

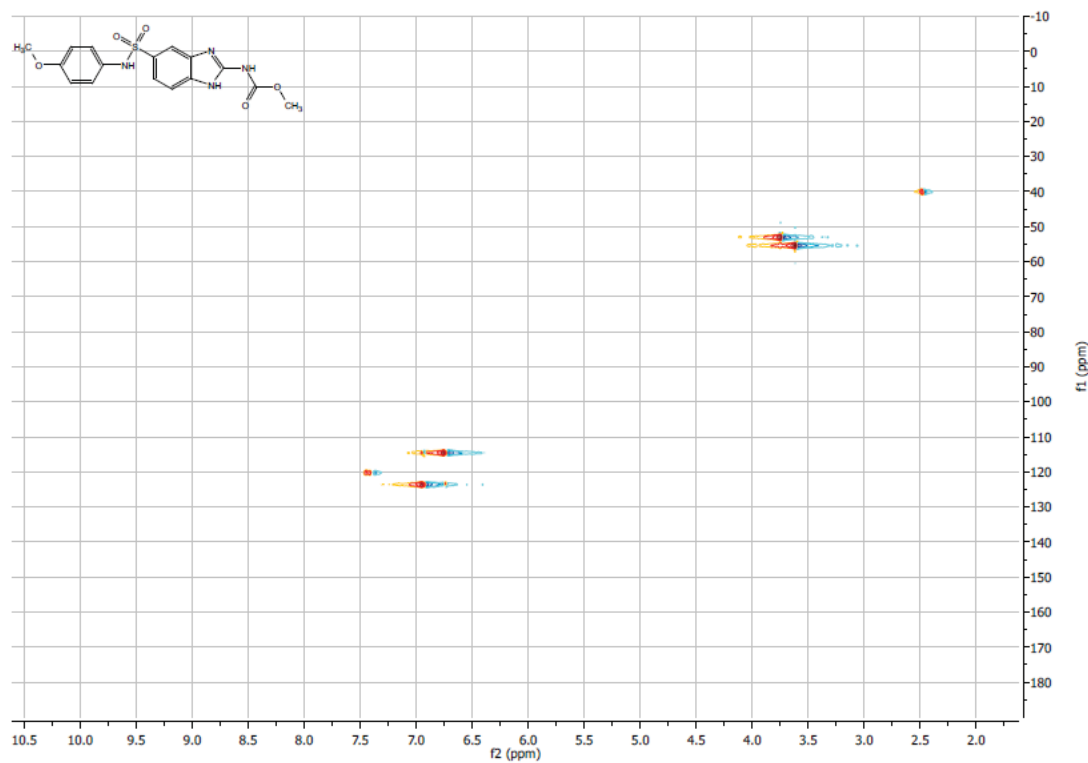


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
377.09141	134240.50	377.09196	-0.55	-1.46	$^{12}\text{C}_{16}^{1}\text{H}_{17}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$

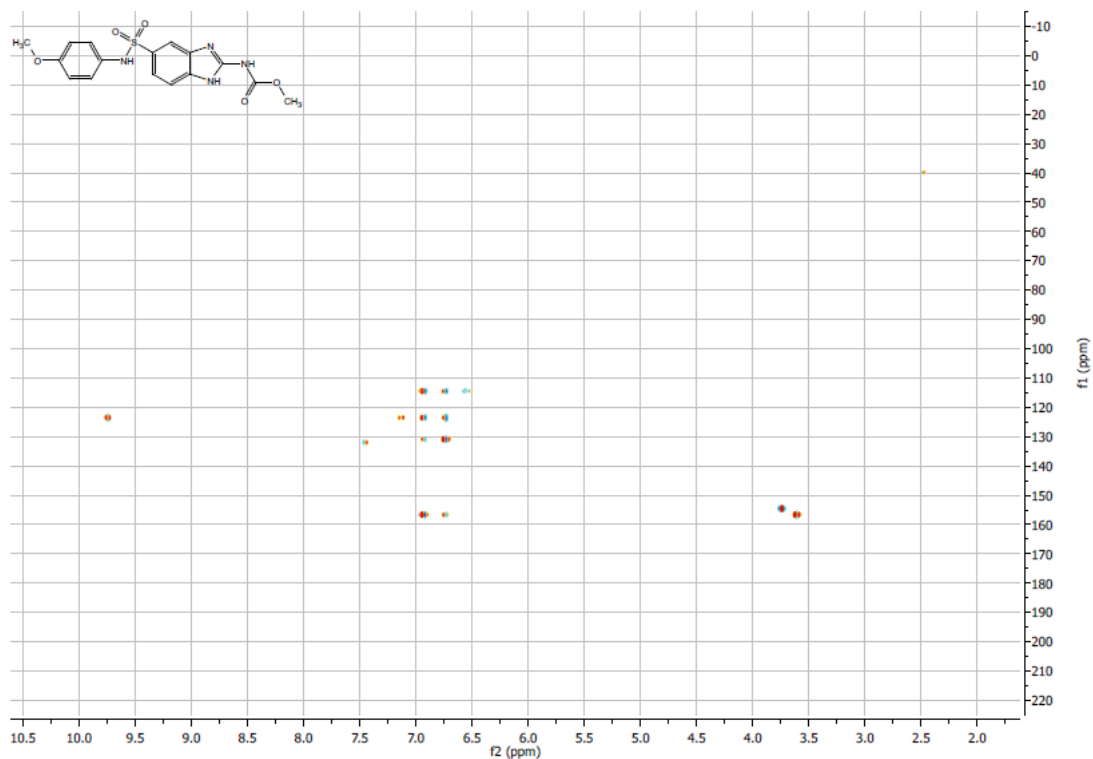
Espectro 34. EM (ESI+, m/z) del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**PCZ4**).



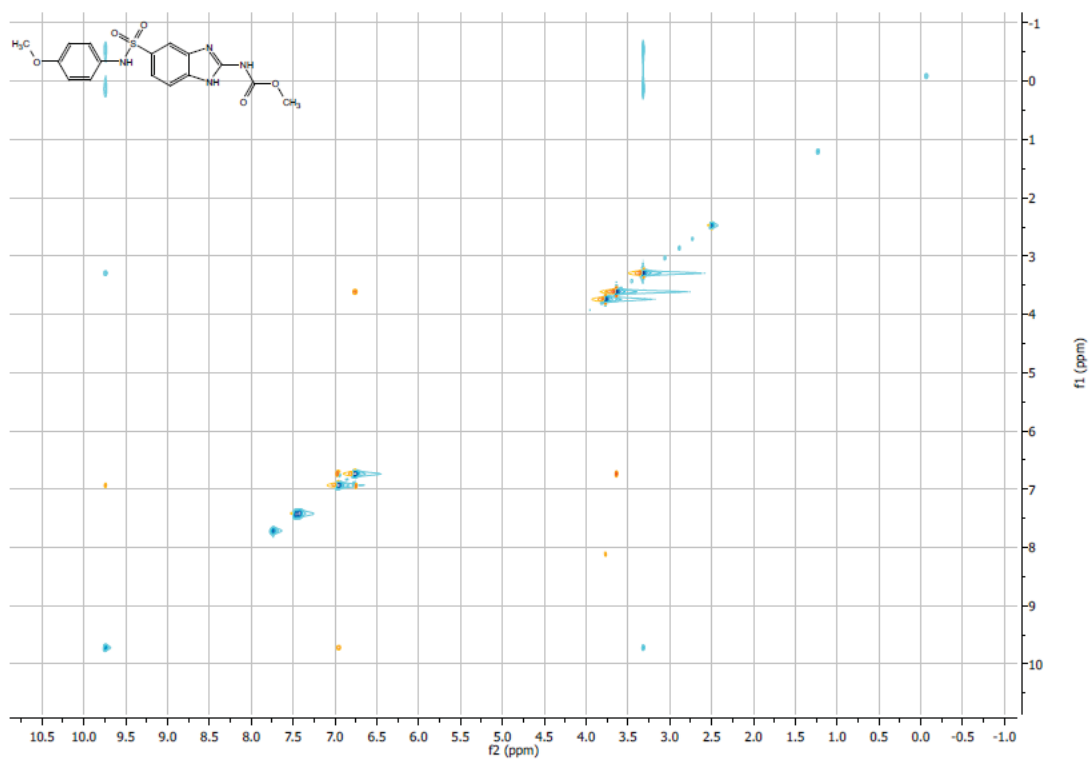
Espectro 35. Experimento COSY del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).



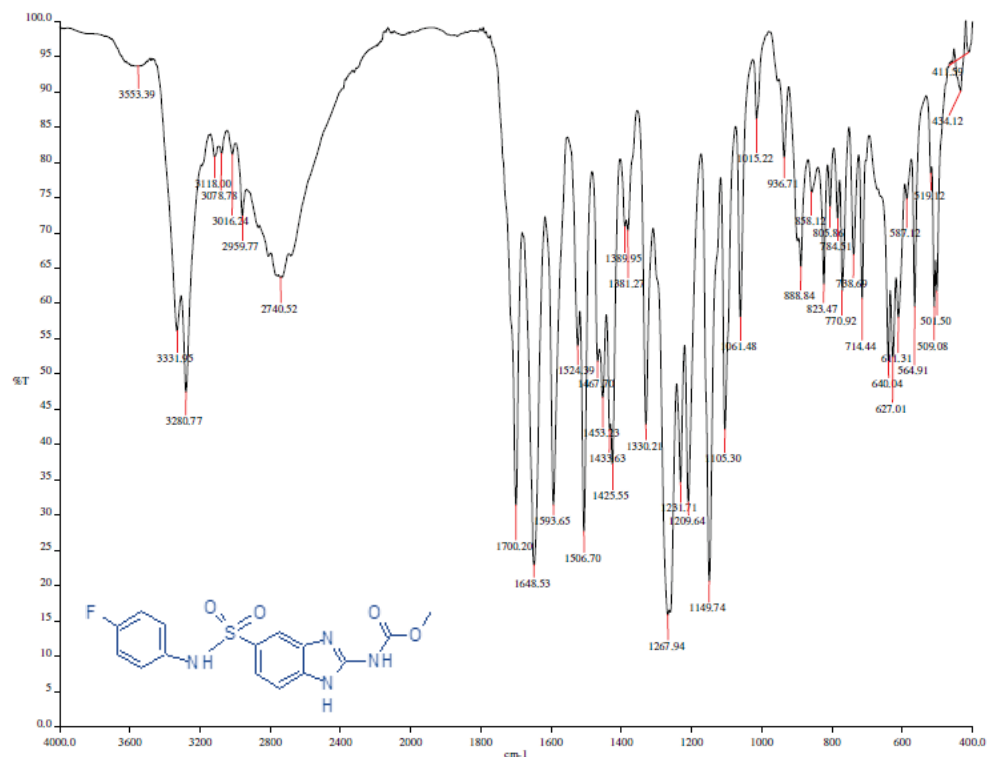
Espectro 36. Experimento HSQC del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).



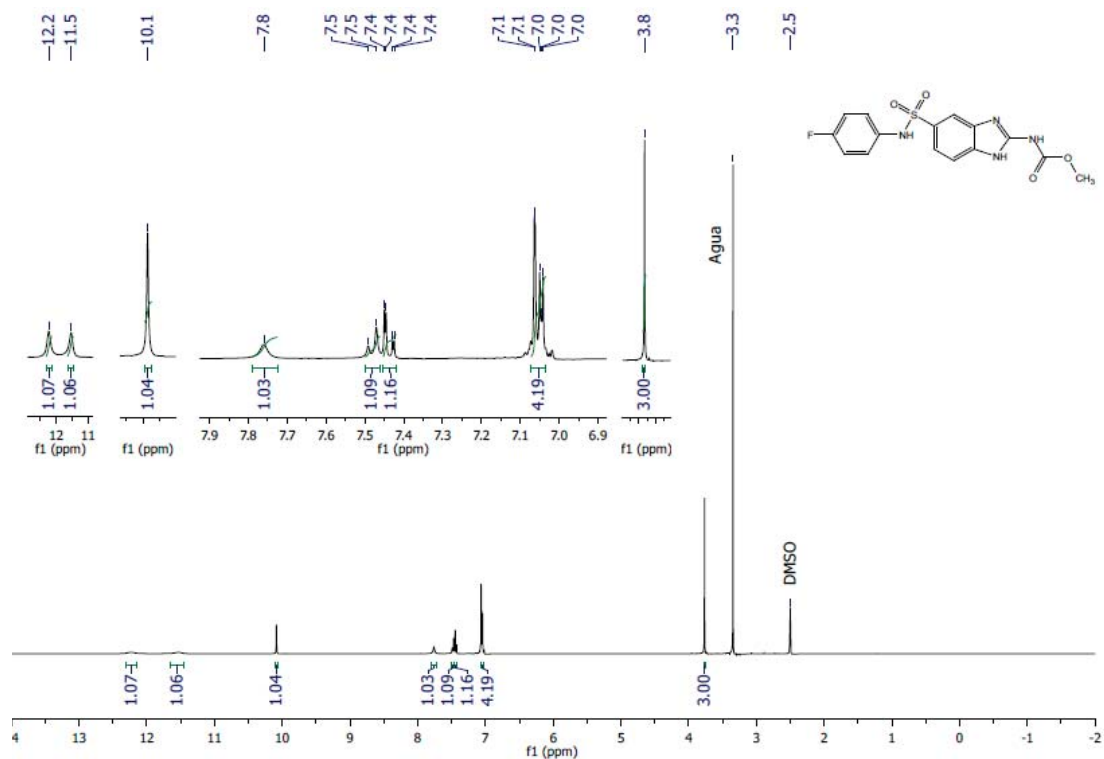
Espectro 37. Experimento HMBC del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).



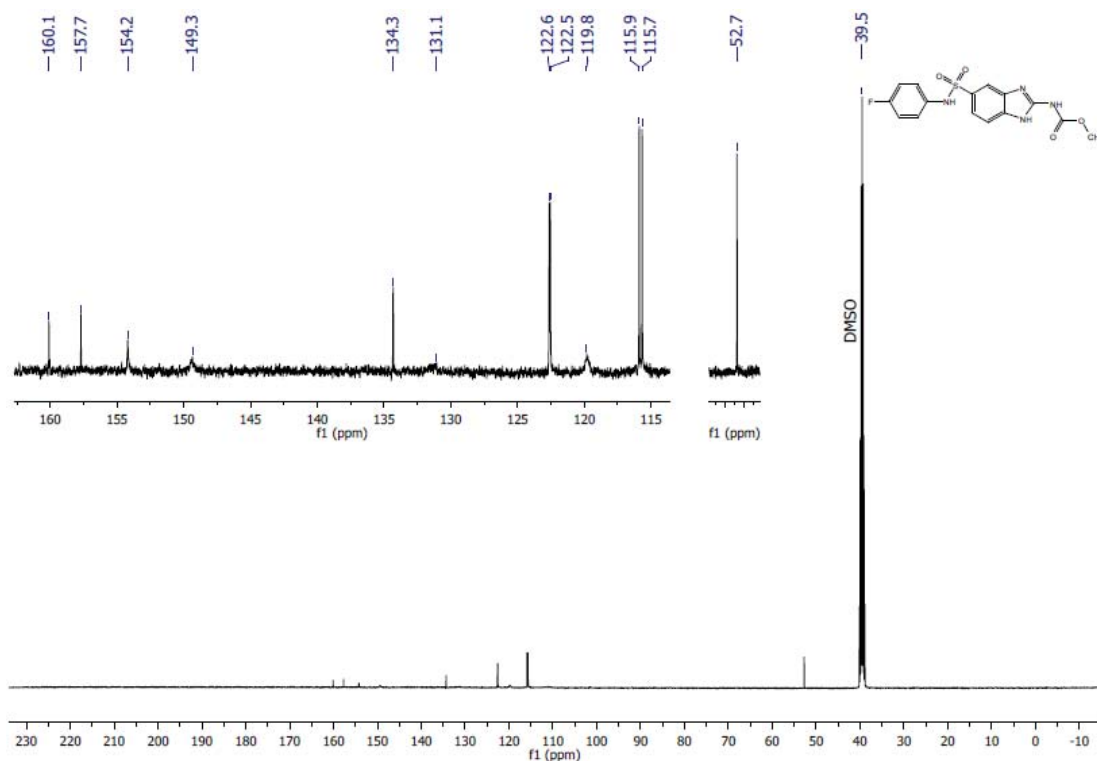
Espectro 38. Experimento NOESY del compuesto {5-[(4-metoxifenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ4).



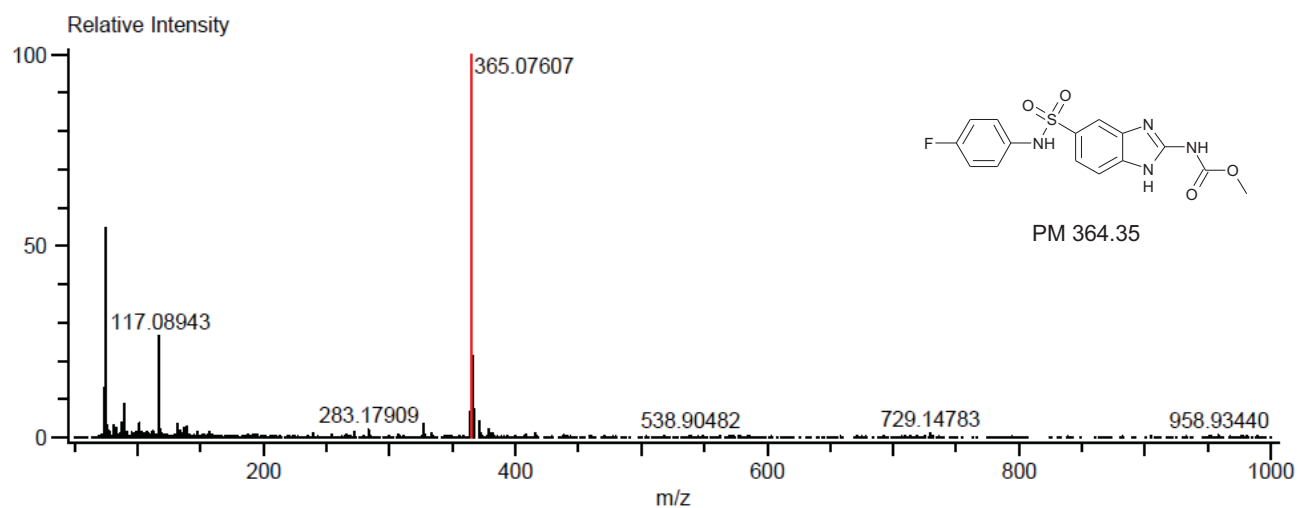
Espectro 39. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoyl]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5).



Espectro 40. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoyl]-1H-benzimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5).

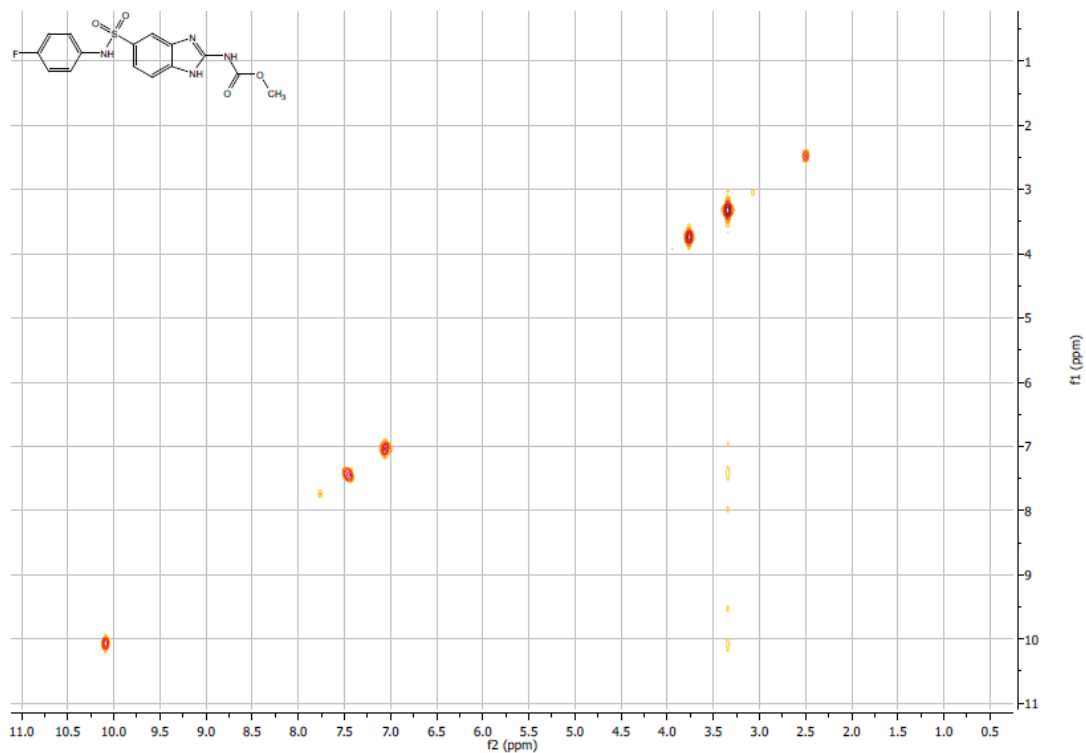


Espectro 41. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**PCZ5**).

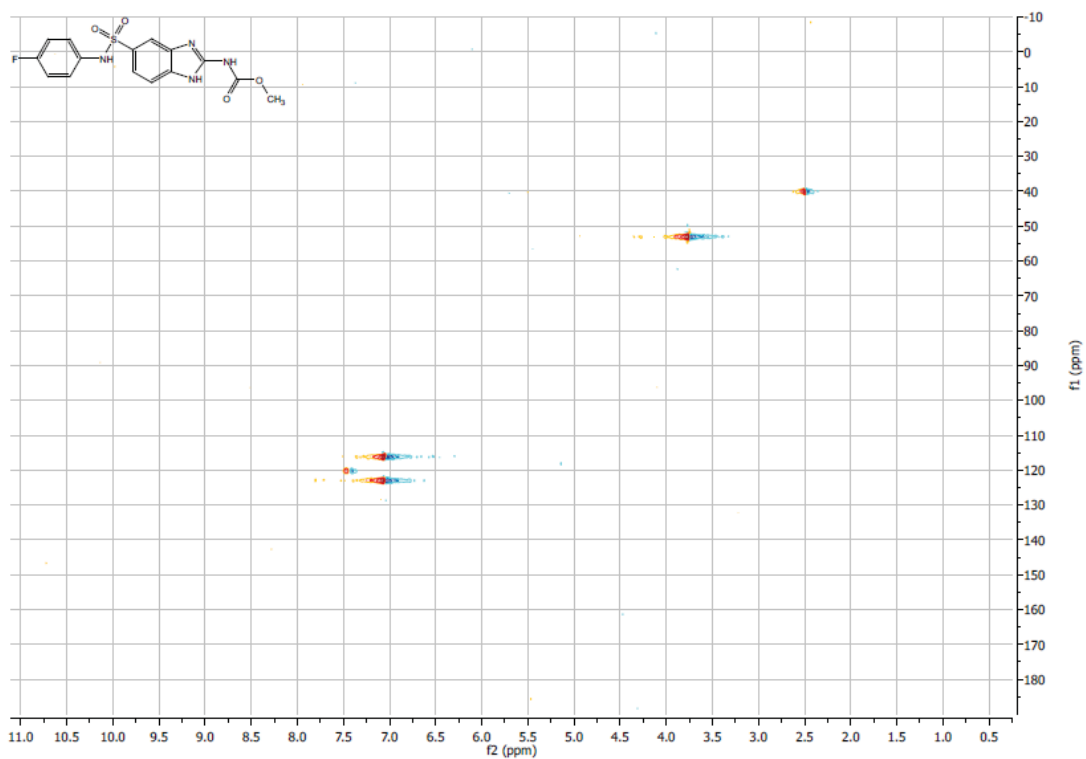


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
365.07607	73842.00	365.09196	-15.89	-43.53	$^{12}\text{C}_{15}^{1}\text{H}_{17}^{14}\text{N}_4^{16}\text{O}_5^{32}\text{S}_1$

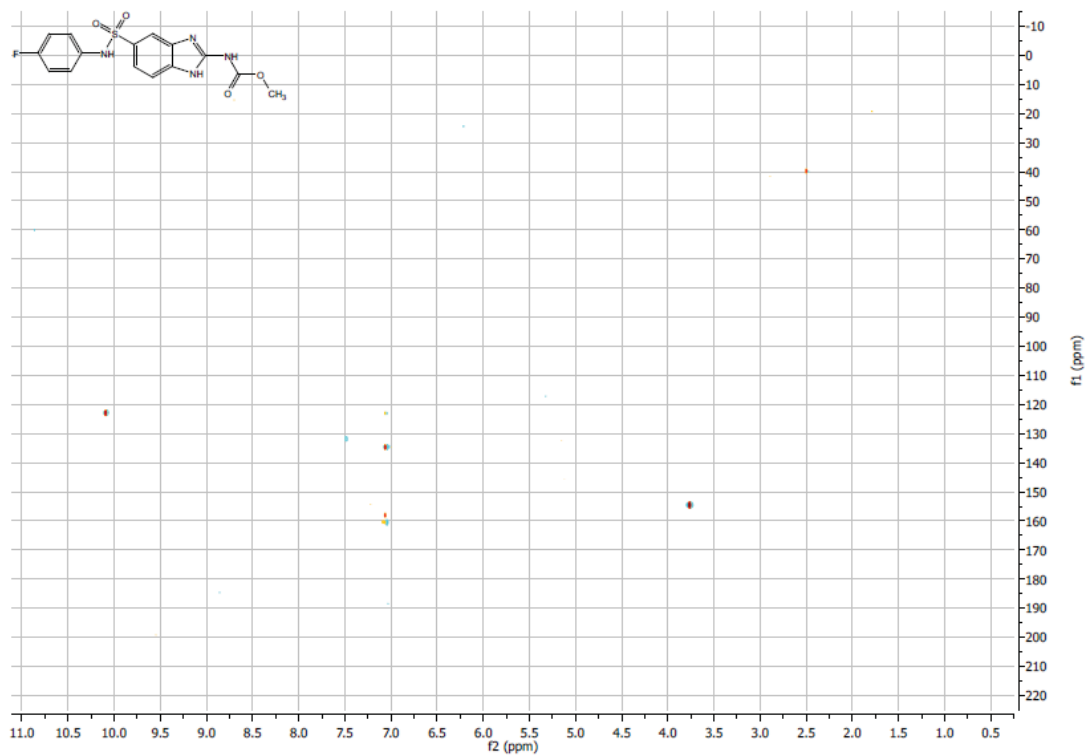
Espectro 42. EM (ESI+, m/z) del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (**PCZ5**).



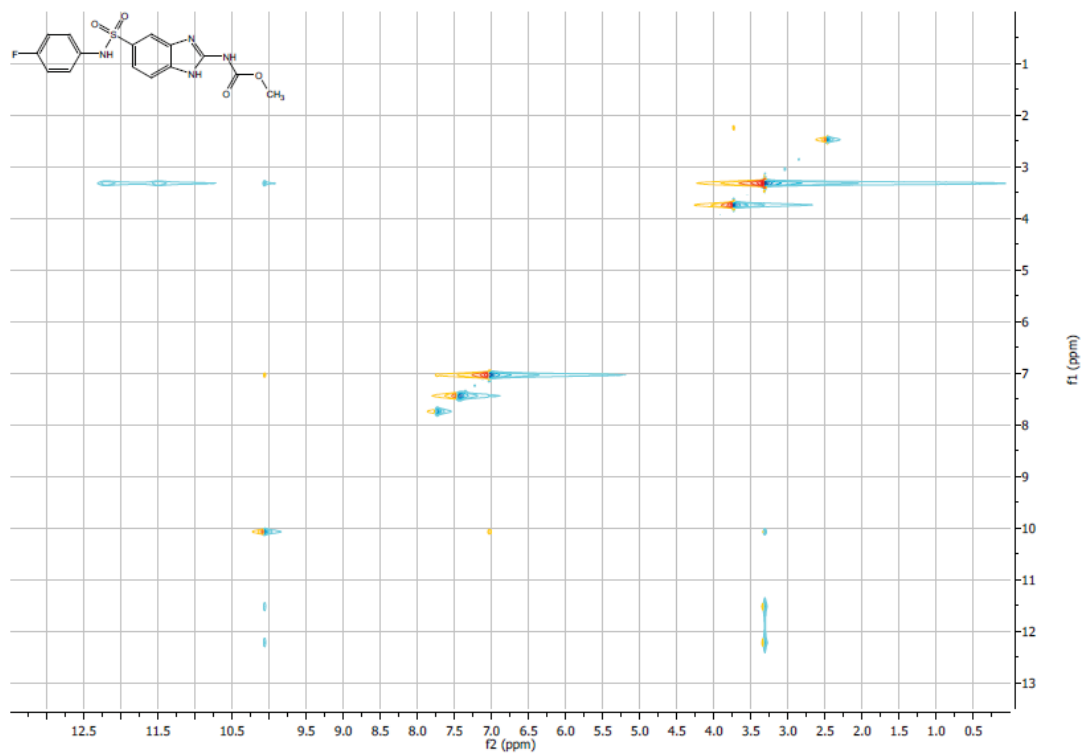
Espectro 43. Experimento COSY del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5).



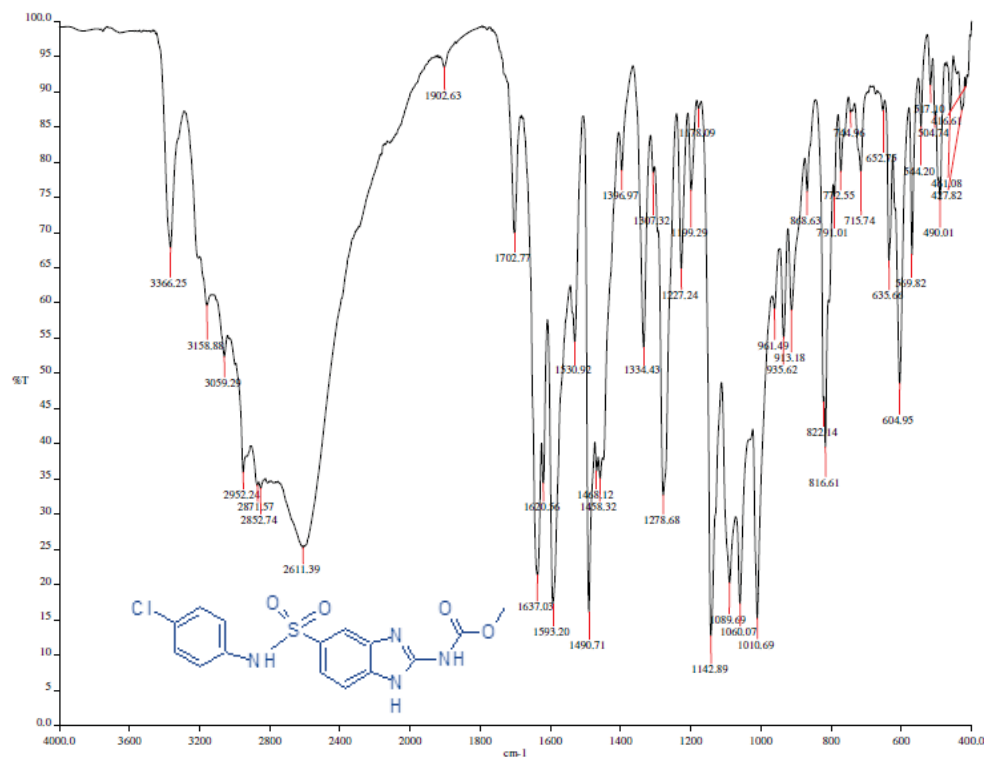
Espectro 44. Experimento HSQC del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ5).



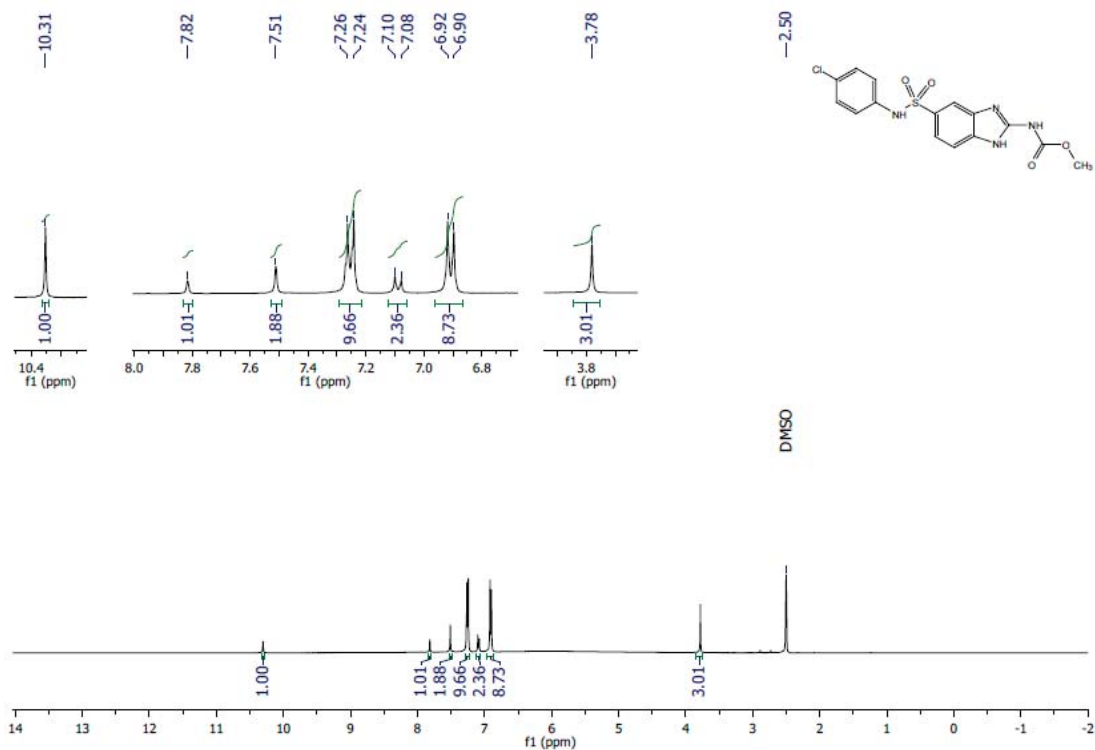
Espectro 45. Experimento HMBC del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ5).



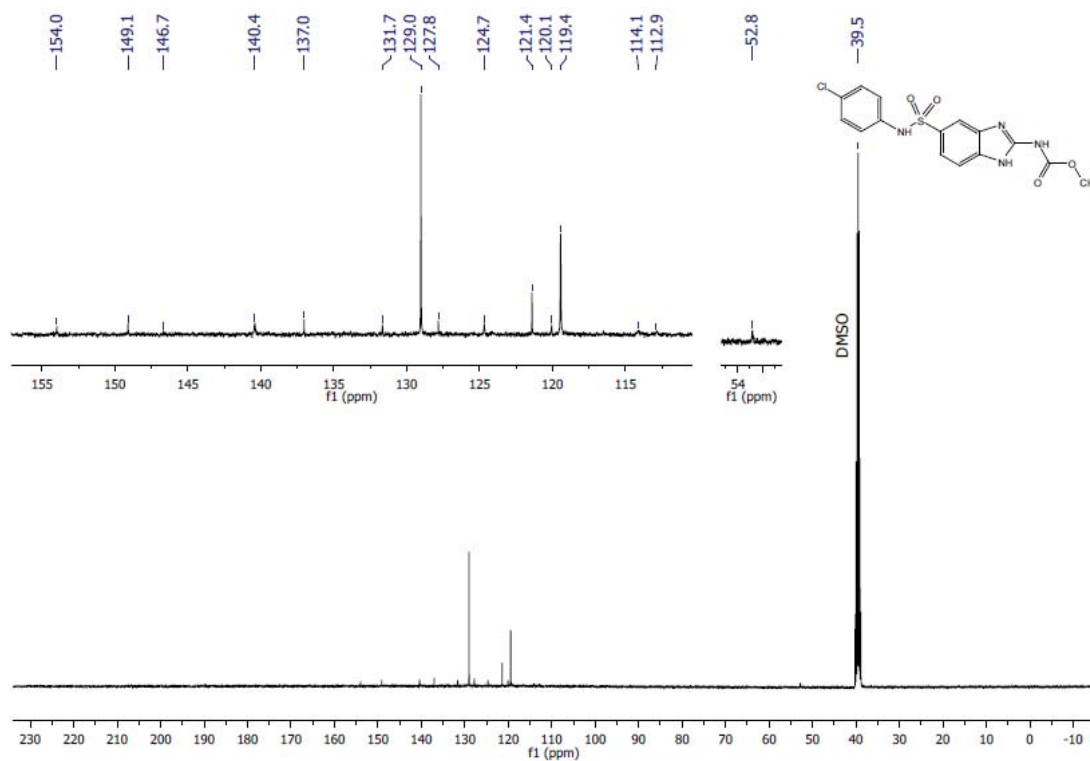
Espectro 46. Experimento NOESY del compuesto {5-[(4-fluorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo (PCZ5).



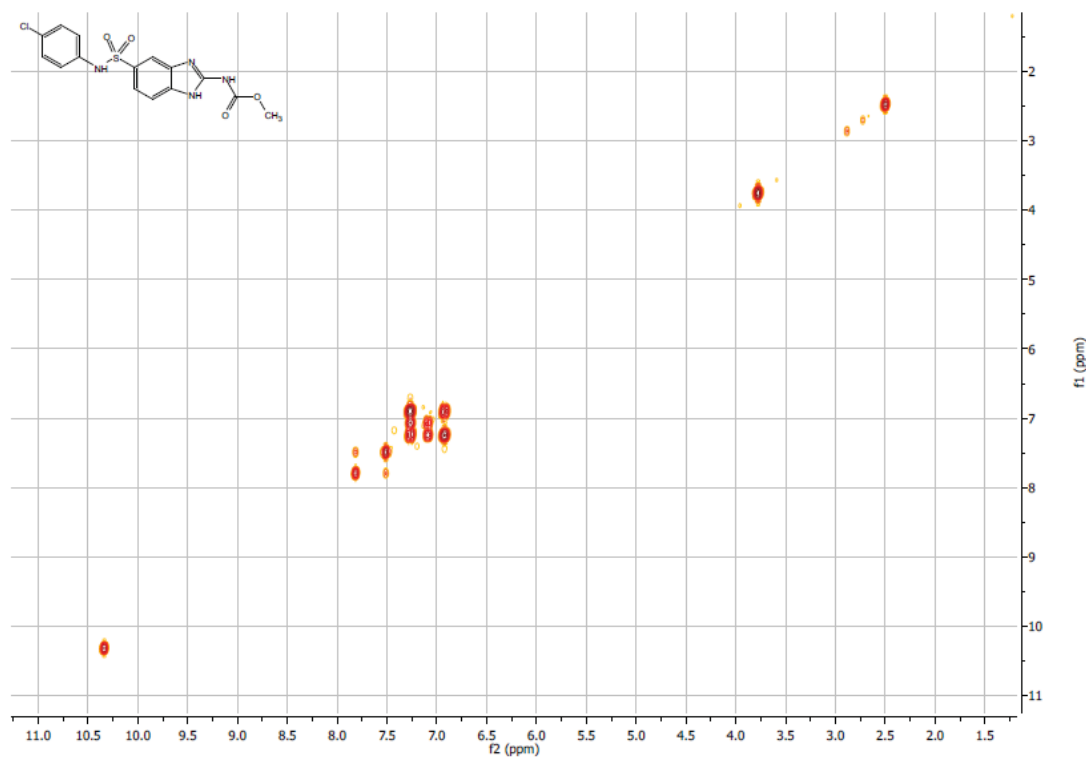
Espectro 47. IR (ATR, cm⁻¹) del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



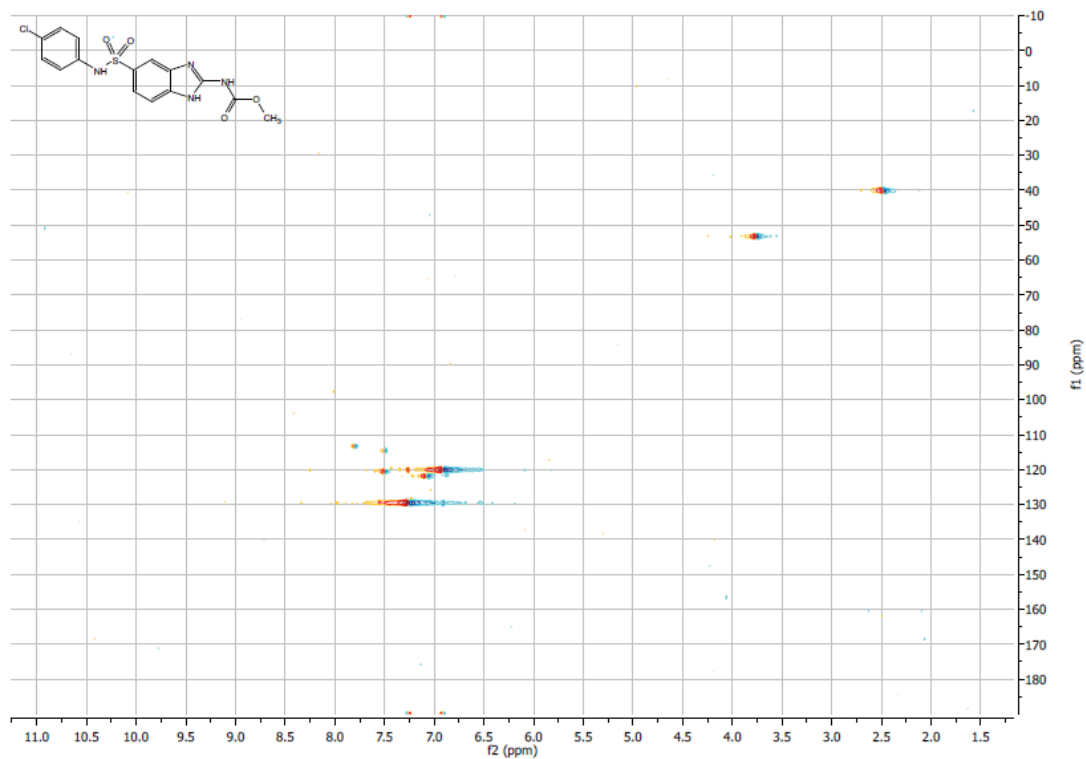
Espectro 48. RMN ¹H (TMS, DMSO-*d*₆, 400 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoi]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



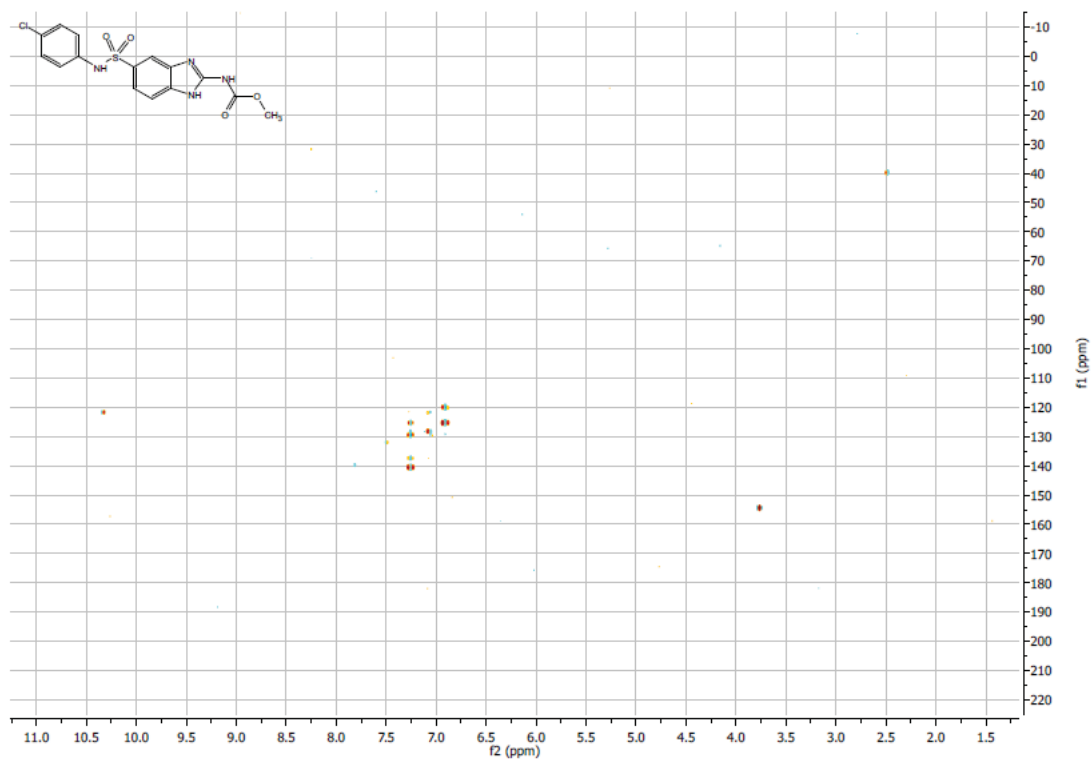
Espectro 49. RMN ^{13}C (TMS, DMSO- d_6 , 100 MHz, δ en ppm) del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



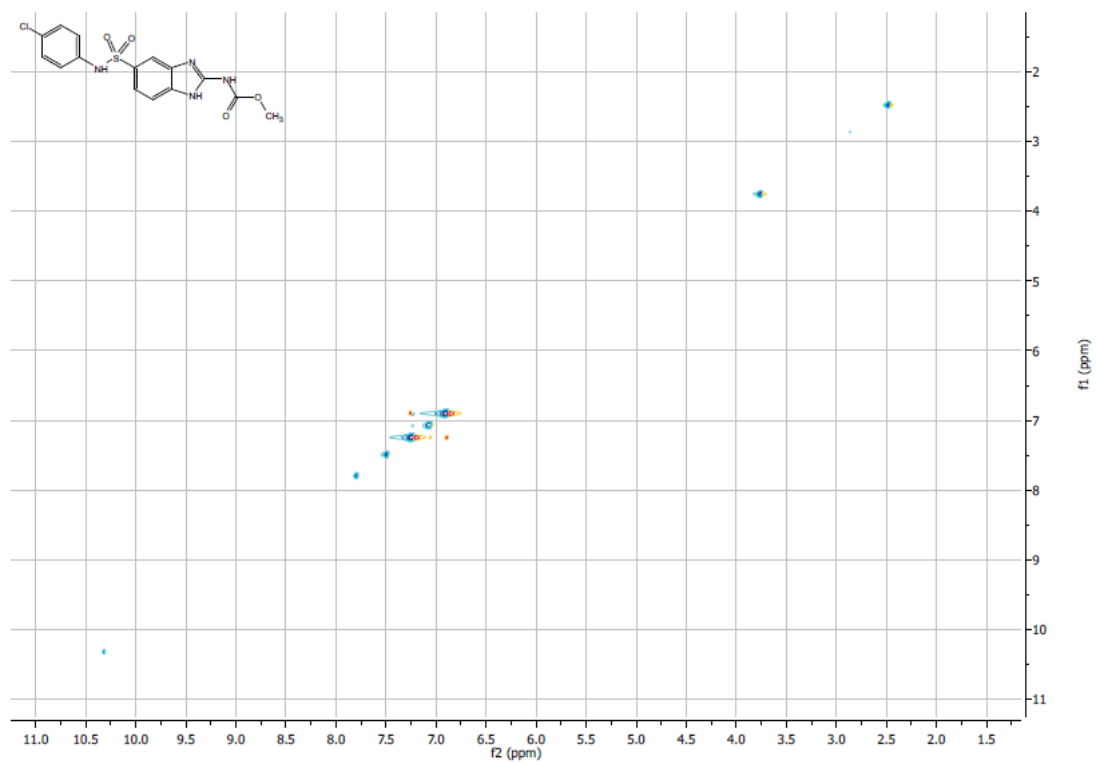
Espectro 50. Experimento COSY del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



Espectro 51. Experimento HSQC del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



Espectro 52. Experimento HMBC del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).



Espectro 53. Experimento NOESY del compuesto {5-[(4-clorofenil)sulfamoil]-1*H*-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (PCZ6).

ANEXO III. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

III.1. Metodología experimental

La evaluación biológica de los compuestos en las líneas celulares se realizó en el laboratorio 206, Edificio F de la Facultad de Química de la UNAM; la evaluación empleando el kit de polimerización de la tubulina en el Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Unidad Xochimilco; y, los ensayos de inmunofluorescencia y extracción de tubulina en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría CMN siglo XXI, IMSS.

III. 1.1. Cultivo celular

Las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón SK-LU-1, adenocarcinoma colorectal SW620 y adenocarcinoma mamario MCF7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y 0.25 µg/mL de antimicótico Fungizone®, a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas de Petri cambiando el medio de cultivo según fuera requerido, cada dos o tres días. Dado que las líneas celulares empleadas son adherentes, el medio de cultivo se retiró por decantación y las células fueron lavadas tres veces con una solución de PBS para eliminar los detritos. Posteriormente, se observó al microscopio que los residuos se eliminaron completamente, se adicionó medio de cultivo fresco y se colocaron en incubación nuevamente. Cabe aclarar que todos los procedimientos se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, tanto la manipulación como los materiales empleados, y dentro de una campana de flujo laminar.

III.1.2. Preparación de soluciones

La preparación de las soluciones siguientes se realizó en condiciones de asépticas, es decir, en una campana de flujo laminar y utilizando material estéril.

III.1.2.1. PBS

La Solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate Buffered Saline o PBS, por sus siglas en inglés) se preparó de tal modo que los siguientes componentes tuvieran la concentración final indicada:

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	1000 mL

Cuando los compuestos se disolvieron, se aforó con agua destilada a 1000 mL y ajustó el pH a 7.4, en caso necesario. Para la esterilización de la disolución, se empleó un sistema de filtración con una membrana de 0.22 μm de diámetro de poro. Se almacenó en un recipiente estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

III.1.2.2. PBS-EDTA

La Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA (PBS-EDTA) se preparó con los componentes a la concentración final que se señala a continuación:

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
EDTA	1 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	1000 mL

Del mismo modo que la solución de PBS, los compuestos se disolvieron, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó con agua destilada a 1000 mL. En la esterilización se empleó un sistema de filtración con una membrana de 0.22 μm de diámetro y se almacenó en un recipiente estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

III.1.2.3. Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

Para la preparación del medio de cultivo DMEM se requirió de los siguientes componentes:

DMEM bajo en glucosa	10 g (1 sobre, Mayimex®)
L-piruvato de sodio 100X	10 mL (Biowest®)
Antibiótico-antimicótico 100X	10 mL (Biowest®)
Aminoácidos no esenciales 100X	10 mL (Biowest®)
Na ₂ CO ₃	63.3 mM
HEPES	9.23 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	900 mL

El contenido del sobre de medio de cultivo se disolvió en 700 mL de agua desionizada y estéril con agitación magnética; posteriormente, se adicionaron los demás componentes y se mantuvo en agitación. Obtenida una mezcla homogénea, se aforó a 900 mL. El medio de cultivo se esterilizó por filtración empleando una membrana de poro de 0.22 µm. Se complementó adicionando 100 mL de Suero Fetal Bovino (SFB, por sus siglas en inglés) Biowest®, correspondiente al 10% del volumen final y al cual previamente se le había inactivado (56 °C/ 1 h). El medio de cultivo se guardó en frascos estériles y a 4 °C. Como control de esterilidad, se colocó una alícuota del medio de cultivo en una caja de Petri estéril y se incubó por 48 h a 37 °C.

El medio de cultivo RPMI 1640 que se empleó en el cultivo de algunas líneas celulares fue preparado de la misma manera, pero sustituyendo el sobre de medio DMEM por uno de RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen®).

III.1.2.4. Medio de congelación

El medio de congelación se obtuvo de la mezcla homogénea de DMSO y medio de cultivo DMEM complementado previamente preparado. Para ello, del volumen deseado de medio de congelación, el 95% correspondió al medio DMEM y el 5% al DMSO.

III.1.2.5. Solución de MTT (2.5 mg/mL)

Para obtener 40 mL de la solución de MTT se pesaron 100 mg de MTT (Aldrich®) en un tubo estéril de 50 mL. Esta cantidad fue disuelta en 20 mL de PBS; posteriormente, el volumen se ajustó a 40 mL y se homogeneizó. La solución se cubrió con papel aluminio para protegerla de la luz y fue almacenada a 4 °C.

III.1.2.6. Solución de XTT/PMS

La solución de XTT/PMS debe ser utilizada de manera inmediata a su preparación; sin embargo, sus componentes pueden almacenarse a -20 °C.

Primero se pesaron 3 mg del catalizador metosulfato de fenazina (PMS, Aldrich®) en un tubo estéril de 1.5 mL; se le adicionó 1 mL de PBS estéril para obtener una disolución de PMS 10 mM. Posteriormente, se pesaron 8 mg de XTT (Aldrich®) en un tubo estéril de 15 mL y se agregaron 8 mL de medio de cultivo sin el indicador de pH rojo fenol a 37 °C; se agitó hasta disolver completamente.

Finalmente, la solución de XTT/PMS se preparó previo a su uso. Para ello, a los 8 mL de la solución de XTT se le adicionaron 20 µL de la solución de PMS y se homogeneizó la mezcla. Es muy importante no almacenar por un tiempo prolongado esta solución ya que no es estable.

III.1.2.7. Solución fijadora de paraformaldehído al 4%

Para preparar 40 mL la solución fijadora, se pesaron 1.6 g de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences®) en un tubo estéril de 50 mL. Se adicionaron 30 mL de PBS estéril previamente calentados a 40 °C y se cerró el tubo. Durante el tiempo necesario para disolver el paraformaldehído, la mezcla se mantuvo en calentamiento en un baño de agua a 40 °C y agitación constante. Una vez obtenida la disolución, se dejó enfriar y se ajustó el volumen a 40 mL. Esta disolución puede ser almacenada en refrigeración a 4 °C y emplearse hasta dos semanas posteriores de su preparación.

III.1.3. Propagación de líneas celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones óptimas de incubación y cambiando constantemente el medio hasta que las líneas celulares cubrían más del 90% de la superficie de la caja de Petri, es decir, alcanzaron una confluencia superior al 90%. En este momento, se procedía a eliminar el exceso de células para evitar que se saturara la caja de Petri por un exceso de confluencia. Para ello, se retiró el medio de cultivo por decantación y se realizaron tres lavados con PBS hasta eliminar completamente los detritos; después del último lavado, se agregaron 3 mL de PBS-EDTA y se colocó en incubación el tiempo necesario para desprender las células, aproximadamente 5 minutos. Las cajas se observaron al microscopio para comprobar que las células habían cambiado su morfología. Posteriormente, se retiró la solución de PBS-EDTA por decantación y se adicionó 1 mL de medio de cultivo a 37 °C; las células se desprendieron con ayuda de una micropipeta. El exceso de células se transfirió a una caja nueva o fue eliminado, según fue necesario. Se adicionaron 3 mL de medio de cultivo y las células se distribuyeron homogéneamente por toda la caja con movimientos suaves. Finalmente, las cajas se colocaron nuevamente en incubación.

III.1.4. Conteo celular con cámara de Neubauer

En el conteo celular, primero se obtuvo una suspensión celular homogénea mediante el proceso descrito en el apartado anterior para despegar células. Posteriormente, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer (Figura III.1.1) de forma que se cubriera la parte central de la cámara; el espacio delimitado entre la cámara y el cubreobjetos es de 0.1 mm. Se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión celular por cada lado de la cámara de recuento, la cual previamente se limpió con etanol al 70%. El conteo se realizó en un microscopio invertido, contando los cuadrantes del área de recuento de los linfocitos.

Para determinar la concentración de la suspensión celular (células/mL), se calculó el promedio de células por cuadrante a partir de la suma de las células contadas en los ocho cuadrantes donde se realizó el recuento y se aplicó la fórmula para el conteo de los linfocitos en cámara de Neubauer:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right) = \text{promedio de células} * (1 * 10^4 \text{ mL}^{-1})$$

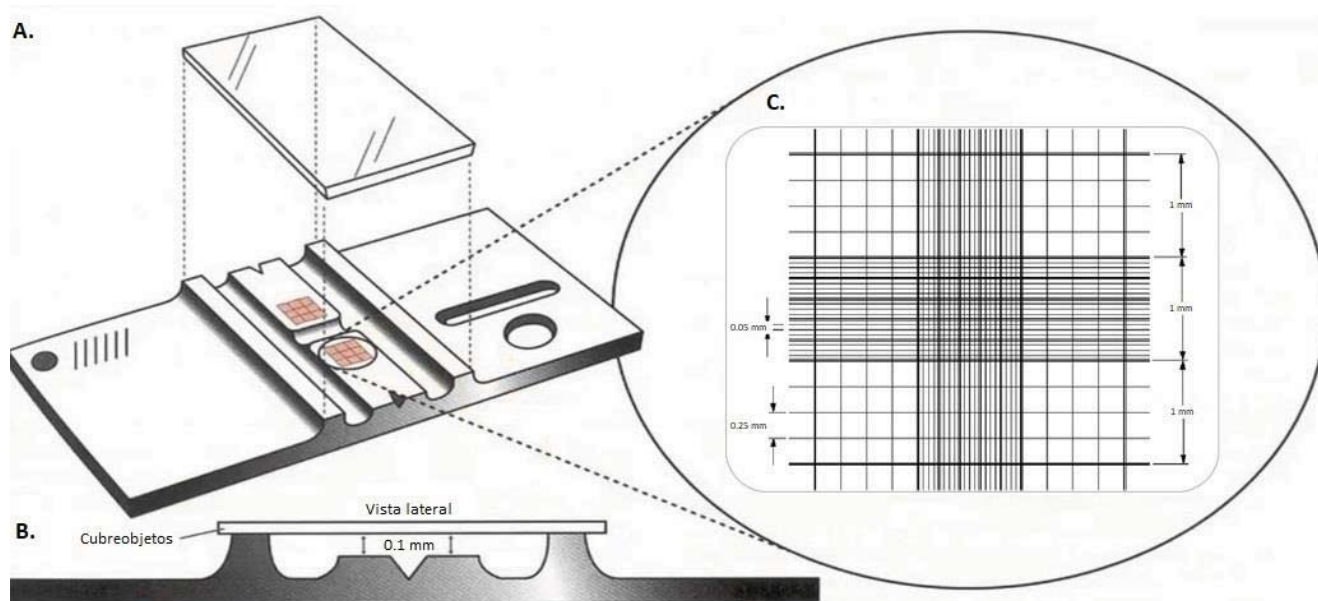


Figura III.1.1. Representación esquemática de una cámara de Neubauer. A. Colocación del cubreobjetos sobre las dos áreas de conteo (naranja). B. Vista lateral. C. Área de conteo, se contaron los cuadrantes de las esquinas (1 mm x 1 mm) integrados por 16 cuadros no sombreados.⁹⁶

En el recuento es necesario tomar en cuenta las siguientes consideraciones: primero, se cuentan únicamente las células refringentes (viables), y segundo, la concentración óptima para conteo en la cámara de Neuvauer es de 10^6 células/mL; si es necesario, se debe diluir la suspensión para obtener una concentración apta para su recuento.

III.1.5. Congelar células

Las líneas celulares fueron congeladas para preservarlas, se requirieron células refringentes con una confluencia superior al 90%. Las células se desprendieron con 3 mL de la solución de PBS-EDTA (ver apartado IV.1.2) y la suspensión celular obtenida se transfirió a un tubo de centrifuga estéril de 15 mL; cada tubo contenía un volumen máximo de 13 mL. Los tubos se colocaron durante 5 minutos a 800 rpm; al finalizar, se retiró el sobrenadante y el botón fue resuspendido con 2.5 mL de medio de congelación. Se colocó una alícuota de 1 mL de la

suspensión celular a cada tubo de criogenia debidamente etiquetado. Los tubos se congelan en posición vertical a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ donde son almacenados hasta su uso.

III.1.6. Descongelar células

Este proceso se lleva a cabo en caso de requerir células. Primero se toma una alícuota, o las necesarias, del almacén a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se deja que se descongelen. Cuando se ha descongelado completamente, los tubos se centrifugan a 800 rpm durante 5 min y se retira el sobrenadante; es necesario que los pasos anteriores se realicen rápidamente ya que este medio contiene DMSO. El botón es resuspendido con 1 mL de medio de cultivo a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se coloca en una caja de Petri de 3 cm de diámetro, se adicionan 2 mL más de medio de cultivo y se distribuye homogéneamente en toda la placa. Finalmente, la caja es colocada en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.1.7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

El cultivo primario de leucocitos fue obtenido de sangre periférica, la cual se extrajo por venopunción de donadores sanos adultos en condiciones de ayuno empleando un sistema vacutainer en tubos con EDTA. Después de obtener la sangre, se mezcló con PBS en una proporción 1:1. Se empleó la técnica de ficoll (Ficoll-Paque PLUS®) para aislar las CMSP, siguiendo las indicaciones del proveedor⁹⁷. Se tomaron 6 mL de ficoll y se colocaron en un tubo de centrifuga estéril de 15 mL, enseguida se adicionaron lentamente por goteo 8 mL de la mezcla de sangre-PBS (Figura III.1.2.A), es importante que las fases no se mezclen. Se centrifugó durante 40 minutos a 1000 rpm y $18\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$; se obtuvo un anillo blanco que contiene los leucocitos como se observa en la Figura III.1.2.B. Las células de esta interfase fueron colectadas con una pipeta Pasteur y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL para realizar tres lavados con 5 mL de PBS cada uno (10 min, 800 rpm). Del último lavado, el paquete celular fue resuspendido con 4 mL de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con 10% de SFB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

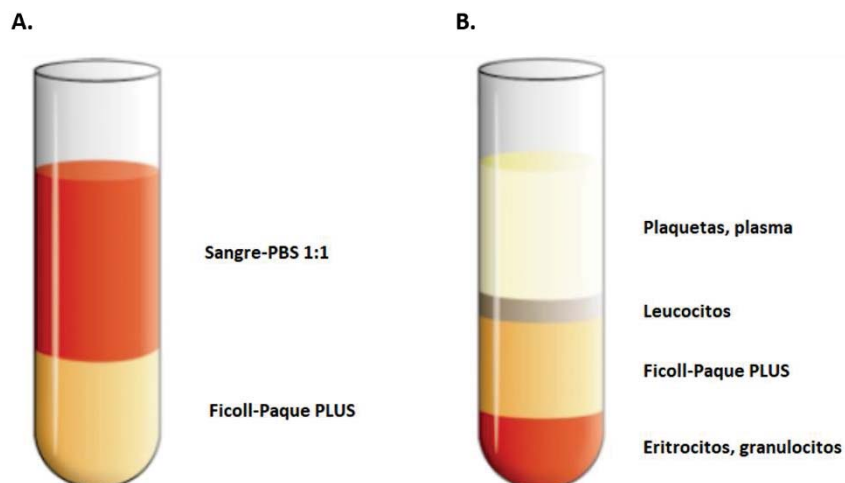


Figura III.1.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Paque PLUS. A. Se muestran dos fases iniciales, la fase superior corresponde a la sangre y la inferior al Ficoll-Paque PLUS. B. Al finalizar el periodo de centrifugación, se observan cuatro fases donde el anillo blanco localizado sobre el Ficoll-Paque PLUS corresponde a los leucocitos.⁹⁷

III.1.8. Diferenciación de células THP-1

Para la diferenciación a macrófagos, se sembraron 4,000 de monocitos THP-1 por pozo en 200 μ L de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se adicionaron 2.5 μ L de una solución forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Aldrich®) 10 μ g/mL en DMSO, obteniendo una concentración final en el pozo de 0.1 μ g/mL.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Las placas se colocaron en incubación durante 72 h a 37 °C, una atmósfera del 5% CO₂. Al término de este periodo, se retiró todo el medio de cultivo y se adicionaron nuevamente 250 μ L de medio RPMI 1640 con 10% SFB. Estas células diferenciadas se emplearon para los ensayos viabilidad celular.

III.1.9. Ensayo de viabilidad celular mediante MTT

La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (Figura III.1.3). Se emplearon las líneas humanas de cáncer SK-LU-1, SW620 y MCF7; y se determinaron las IC₅₀ de los compuestos PCZ1-PCZ6, los controles NZ (Aldrich®) y cisplatino (Aldrich®).

Primero, se sembraron 4,000 células/pozo en 200 μ L de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB en una placa de 96 pozos. Transcurridas 24 h, se administró el tratamiento

respectivo, para lo cual se realizaron consideraciones dependiendo el compuesto evaluado. Esto es, el volumen de tratamiento adicionado por pozo fue de 50 μL , considerando el compuesto disuelto en el vehículo DMSO y el medio de cultivo DMEM; segundo, las concentraciones finales en los pozos debían obedecer el siguiente esquema de tratamiento: **PCZ1-PCZ6**: 50, 40, 30, 20, 10, 5 μM ; **NZ**: 1.5, 0.75, 0.375, 0.2, 0.125, 0.05 μM en SK-LU-1 y SW620; y 5, 3, 1.5, 0.75, 0.35, 0.15 μM en MCF7; y **cisplatino**: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 μM . Es importante mencionar que se evitó que la concentración máxima de DMSO por pozo superara el 1%, ya que podría afectar la viabilidad celular.

Posterior a la aplicación del tratamiento, las placas se mantuvieron en incubación durante 72 h a 37 °C, una atmósfera del 5% CO_2 . Al concluir este periodo, se adicionaron 20 μL por pozo de la solución de MTT (2.5 mg/mL) y se colocó nuevamente en incubación por 2 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo con ayuda de una micropipeta y los cristales de formazán se disolvieron con 200 μL de DMSO. Se determinó la absorbancia a 540 nm empleando un lector de placas Epoch®.

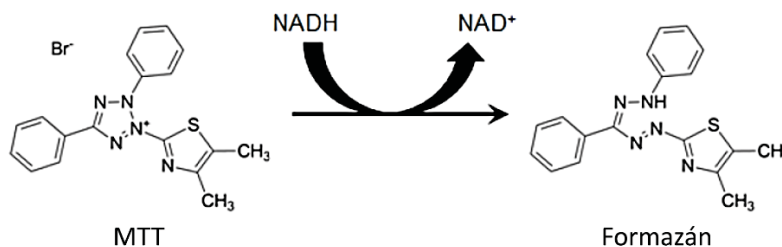


Figura III.1.3. Estructuras del MTT y el producto colorido formazán.

Con los datos de absorbancia obtenidos ($Abs_{\text{tratamiento}}$), se calculó el porcentaje de viabilidad (%V) en relación a las células sin tratamiento (Abs_{control}):

$$\%V = 100 * \frac{Abs_{\text{tratamiento}}}{Abs_{\text{control}}}$$

Con el porcentaje de viabilidad se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación (%) de la siguiente manera:

$$\%I = 100 - \%V$$

Finalmente, se realizó una curva del %I en función de la concentración del tratamiento y se hizo un análisis de regresión no lineal empleando el software OriginPro® 7.0; con ello se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). La determinación de cada CI₅₀ se realizó por triplicado, en experimentos independientes.

III.1.10. Ensayo de viabilidad celular mediante XTT

En el caso de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), la evaluación de la viabilidad celular se realizó a través del ensayo colorimétrico de XTT (Figura III.1.4).

Para ello, se sembraron 20,000 células/pozo en 200 µL de medio de cultivo RPMI sin rojo de fenol, suplementado con 10% de SFB en una placa de 96 pozos. Transcurridas 24 h, se administró el tratamiento respectivo (50 µL), tomando en cuenta las consideraciones mencionadas en el apartado anterior. Posteriormente, las placas se mantuvieron en incubación a 37 °C, una atmósfera del 5% CO₂ durante 72 h.

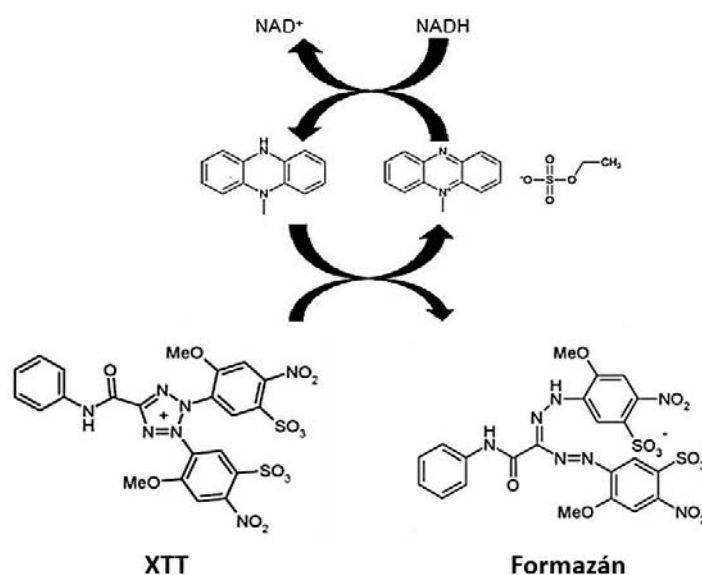


Figura III.1.4. Estructuras del XTT y el producto formazán, colorido y soluble.

Al finalizar este periodo, se adicionaron 20 μ L por pozo de la solución de XTT/PMS y se colocó nuevamente en incubación durante 2 h. Por último, las placas se retiraron de incubación y se determinó la absorbancia a 450 nm con un lector de placas Epoch[®].

El tratamiento de los datos se realizó de la misma forma que en el ensayo de MTT (ver apartado III.2) y se determinó la CI_{50} en las CMSP por triplicado, en experimentos independientes.

III.1.11. Ensayo polimerización de la tubulina

Se realizó un ensayo *in vitro* para monitorizar la polimerización dependiente del tiempo de tubulina empleando un kit de polimerización de la tubulina (Cytoskeleton[®], Cat # BK004P). Se evaluó el compuesto PCZ1 (50 μ M), los controles NZ (10 μ M) y taxol (10 μ M).

Primero, se procedió a la preparación de los reactivos:

- El amortiguador general se reconstituyó con 10 mL de agua destilada estéril.
- El amortiguador glicerol se reconstituyó con 10 mL de agua destilada estéril.
- El *stock* GTP se disolvió con 100 μ L de agua destilada estéril, se hicieron alícuotas de 10 μ L y se almacenaron a -70 °C.
- El tubo con 10 mg de tubulina siempre se mantuvo en nitrógeno líquido. Se mezcló 1.1 mL de amortiguador general frío y 10 μ L de *stock* GTP; posteriormente, la tubulina se resuspendió con la mezcla anterior y se hicieron alícuotas (5 x 200 μ L). Cada alícuota es suficiente para realizar 6 ensayos, y se mantuvieron a -70 °C.
- El taxol se disolvió en 100 μ L de DMSO.

En cuanto a la medición, se empleó un equipo Epoch[™] 2 y se establecieron las siguientes condiciones: cinética, 61 ciclos (1 lectura/min), 340 nm, 37 °C, con una agitación inicial de 5 s en orbital. Previo al inicio de los ensayos, la placa de 96 pozos de media área se precalentó a 37 °C durante 30 min. Es importante mantener constante la temperatura ya que se pierde el 5% de la polimerización de la tubulina por cada grado que disminuya.

Posteriormente, se procedió a realizar los ensayos tomando en cuenta que por cada alícuota de tubulina (200 μ L) pueden hacerse seis evaluaciones. Primero, se preparó el amortiguador de polimerización de tubulina (TP) a 4 °C con los siguientes componentes: 750 μ L de amortiguador general, 250 μ L de amortiguador glicerol y 10 μ L de *stock* GTP. El amortiguador TP se almacena a 4 °C, no más de 4 h después de su preparación debido a que el GTP es lábil.

Del amortiguador TP se tomaron 500 μ L y se colocaron a temperatura ambiente para solubilizar los compuestos. Por pozo se colocaron 10 μ L de compuesto de interés en amortiguador TP a una concentración diez veces mayor de la deseada; en el caso de los pozos control, solo se emplearon 10 μ L de amortiguador TP. La placa se incubó durante 2 min a 37 °C.

El siguiente paso es crítico porque la tubulina podría comenzar a polimerizar a temperatura ambiente; por tanto, la tubulina diluida se emplea inmediatamente a su preparación. Para ello, se descongeló un vial de tubulina (200 μ L) en un baño de agua a temperatura ambiente y se diluyó con 420 μ L de amortiguador TP frío. La concentración final fue 3 mg/mL de tubulina en 80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10.2% glicerol.

Por cada pozo con tratamiento, se adicionan 100 μ L de tubulina diluida y se comienza la lectura con las condiciones antes indicadas.

Con los datos obtenidos de las lecturas, se realizó un gráfico de la densidad óptica (mOD) en función del tiempo (min) y se calculó la velocidad máxima (V_{max}) de polimerización de la tubulina. Las V_{max} fueron comparadas empleando el programa GraphPad Prism 5® (ANOVA, $p < 0.05$).

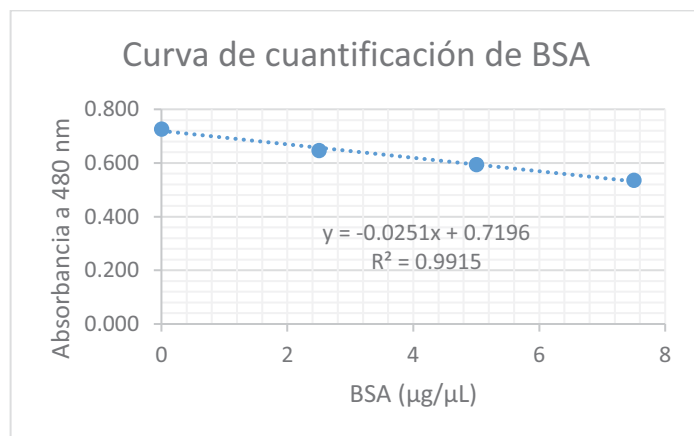
III.1.12. Análisis por *Western blot* (inmunoelctrotransferencia) de la tubulina soluble y polimerizada

En este ensayo se realizó una comparación de la cantidad de tubulina soluble y polimerizada en células SK-LU-1 tratadas con los compuestos PCZ1, PCZ4, LCG1 y NZ; para ello se empleó la metodología reportada previamente para la extracción de ambas fracciones.⁶¹

Primero, se sembraron 20×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB. Transcurridas 24 h, se administraron los compuestos a su respectiva CI_{50} y se colocó en incubación a 37 °C, una atmósfera humidificada con 5% CO_2 , durante 24 h. Al concluir este periodo, se realizaron tres lavados con PBS y se procedió a la extracción de ambas fracciones.

Para colectar las fracciones solubles, las células fueron permeabilizadas con 1000 μ L de amortiguador de lisis [80 mM Pipes-KOH pH 6.8, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% Tritón X-100, 10% glicerol y 0.1% coctel inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich®)] y se incubaron durante 3 min a 30 °C. Al finalizar, el sobrenadante fue removido suavemente, esta fracción corresponde a la de tubulina soluble. Al remanente celular se le adicionaron 1000 μ L de amortiguador de Laemmli [180 mM Tris-Cl pH 6.8, 6% SDS, 15% glicerol y 7.5% β -mercaptoetanol] y se colocó en incubación a 95 °C durante 3 min. Nuevamente se colectó el sobrenadante, en este caso corresponde a la fracción de tubulina insoluble. Posteriormente, las fracciones de tubulina soluble y polimerizada se cuantificaron con el kit de cuantificación de proteínas 2-D Quant kit®.

A.



B.

Tratamiento	Concentración (μ g/ μ L)	
	Fracción soluble	Fracción polimerizada
Control	1.017	0.451
NZ	0.774	0.339
LCG1	0.674	0.351
PCZ1	0.710	0.519
PCZ4	0.877	0.582

Figura III.1.5. Cuantificación de proteína con 2-D Quant kit®. A. Curva de cuantificación de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés). B. Resultados de cuantificación de las fracciones soluble y polimerizada de la tubulina.

Electroforesis. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida y amortiguador de dodecilsulfato (SDS-PAGE), cada gel (8 cm x 12 cm) se preparó con los siguientes componentes:

- Gel separador 12%: 3300 μ L agua destilada, 4000 μ L poliacrilamida 30%, 2500 μ L Tris 1.5 M (pH 8.8), 100 μ L SDS 10%, 100 μ L persulfato de amonio (PSA) 10% y 4 μ L TEMED.
- Gel concentrador 5%: 1050 μ L agua destilada, 250 μ L poliacrilamida 30%, 190 μ L Tris 1 M (pH 6.8), 15 μ L SDS 10%, 15 μ L PSA 10% y 1.5 μ L TEMED.

Los geles se colocaron en las cámaras de electroforesis y se agregó amortiguador de corrida (25 mM Tris-base, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3). A continuación, se cargaron 30 μ g de proteína de cada tratamiento/pozo, dejando el primero libre para colocar 4.5 μ L de marcador de peso molecular preteñido de amplio rango Bio-Rad®. Los geles se corrieron a 100 V, durante aproximadamente 60 min.

Transferencia. Las proteínas separadas en el gel SDS-PAGE se transfieren a una membrana para que su detección por anticuerpos sea más accesible. La membrana que se empleó fue de PVDF, previamente hidratada (2 min en MeOH, 2 min en agua destilada).

Las membranas se colocaron adecuadamente sobre los geles y se prepararon las cámaras con amortiguador de transferencia (25 mM Tris-base, 192 mM glicina y 20% MeOH, pH 8.3) frío. La transferencia se realizó una durante 1.5 h a 100 V.

Western blot. En este paso, se procedió a la detección la β -tubulina en las fracciones soluble y polimerizada. Primero, las membranas se bloquearon con albúmina al 3% durante toda la noche a 4°C con agitación constante.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal primario anti β -tubulina T0198 Aldrich® (1:500) durante 2 h a 37 °C. Terminado este periodo, se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min cada uno. Por último, se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución 1:1000, durante 2 h a 37 °C. Nuevamente se realizaron tres lavados de la misma forma y se procedió al revelado con el medio cromogénico.

En cuanto a la preparación del medio cromogénico, se realizó en el momento de uso, con los siguientes componentes:

- 5 mL de amortiguador de Et₃N pH 7.5 (128 mM NaCl, 20 mM Et₃N).
- 1 mL 4-cloro-1-naftol (disolver una tableta de 30 mg en 10 mL de MeOH).
- 2.5 µL de H₂O₂ 30%.

Cada membrana se sumergió en 6 mL del medio cromogénico, se mantuvo en agitación hasta que se observaron las bandas. Finalmente, se paró la reacción con agua destilada y se colocaron a secar a temperatura ambiente.

Para cuantificar la intensidad de las bandas, se tomaron fotografías a la membrana y se analizaron por densitometría (píxeles) empleando el programa Quantity One®. Los resultados se expresaron en porcentaje, tomando como 100% a la banda correspondiente al control sin tratamiento. Este experimento se realizó por duplicado.

III.1.13. Análisis de la distribución de la β -tubulina mediante inmunofluorescencia indirecta

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta para analizar la distribución de los microtúbulos en las células. Primero, se sembraron células SK-LU-1 sobre cubreobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro en cajas de Petri de 3.5 mm de diámetro; a las 24 horas, se les aplicó el tratamiento: PCZ1, PCZ4, LCG1 y NZ, a su CI50 respectivamente. Las células se incubaron durante 24, 48 y 72 h, a 37 °C, una atmósfera del 5% CO₂.

Transcurrido cada periodo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS. Posteriormente, las células de cada muestra fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4, 10 min a temperatura ambiente. El proceso de permeabilización se realizó aplicando a cada muestra 1 mL de una solución de Triton X-100 (Aldrich®) al 0.5% y SDS (Aldrich®) al 0.5% en PBS, durante 10 min. Posterior a la permeabilización, las células fueron bloqueadas con 1 mL albúmina sérica bovina (BSA, por

sus siglas en inglés) al 3%, 1 h a temperatura ambiente. Entre cada uno de estos pasos, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS.

En el siguiente, cada muestra se incubó con el anticuerpo monoclonal primario anti β -tubulina T0198 Aldrich® (1:500) durante 1 h y se realizaron cinco lavados al finalizar el tiempo de incubación. Por último, cada muestra se incubó simultáneamente con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), a una dilución 1:500 y 1:600, respectivamente, 1 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se realizaron cinco lavados con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre un portaobjetos de 25 x 75 mm, con 10 μ L de Vectashield®. Para la visualización y captura de las imágenes se empleó un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41).

III.1.14. Detección de la ciclina B por inmunofluorescencia indirecta

Este experimento se realizó bajo las mismas condiciones que el ensayo de inmunofluorescencia indirecta del apartado III.1.13, solo se cambió el anticuerpo primario por el anticuerpo monoclonal anti ciclina B Millipore® (1:500).

III.2. Evaluación citotóxica en células SK-LU-1

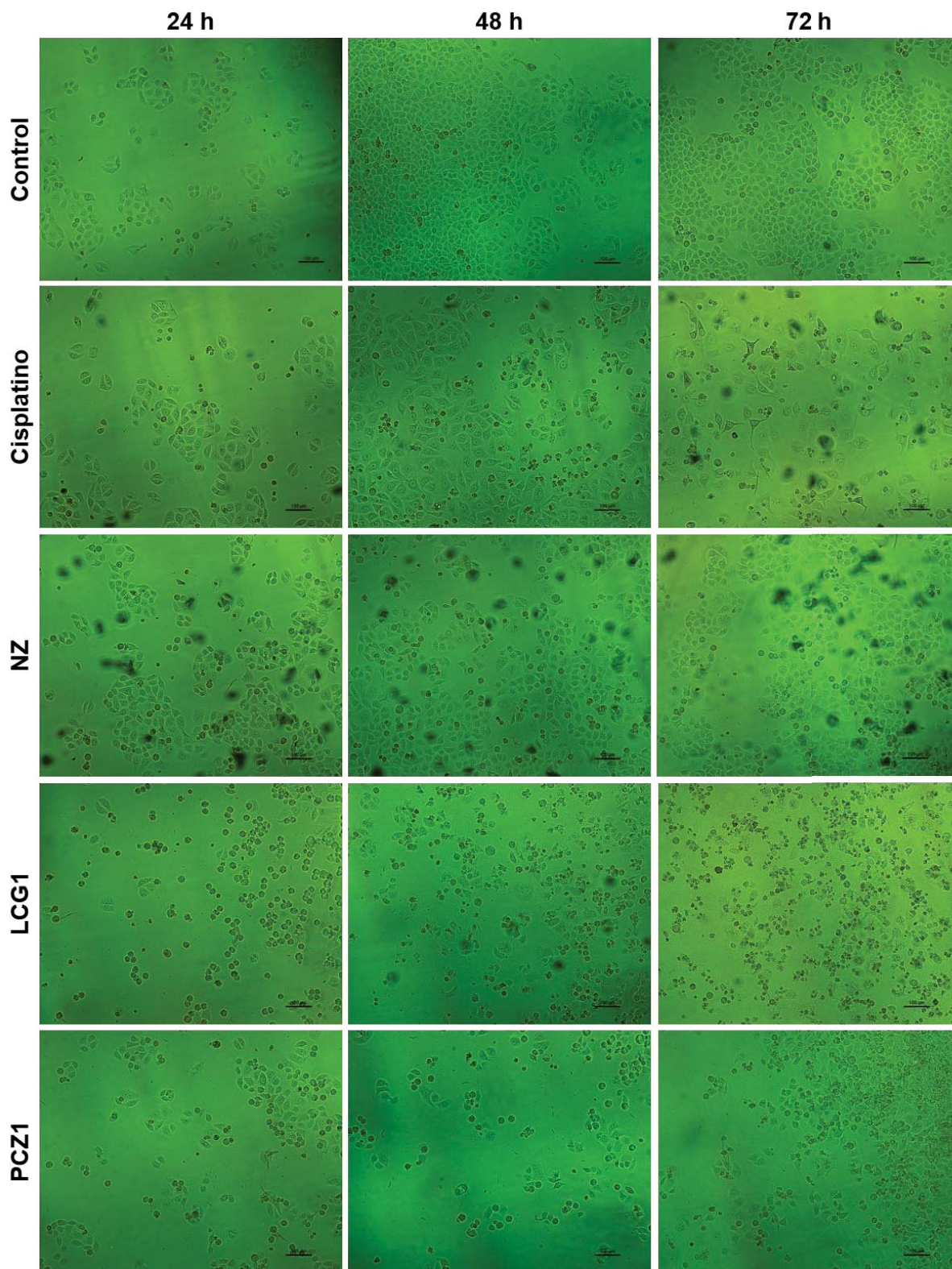


Figura III.2.1. Cambios morfológicos en las células SK-LU-1 bajo los tratamientos: Cisplatino (10.7 μM), NZ (0.08 μM), LCG1 (0.08 μM) y PCZ1 (46.9 μM), a su respectiva CI_{50} durante 24, 48 y 72 h.

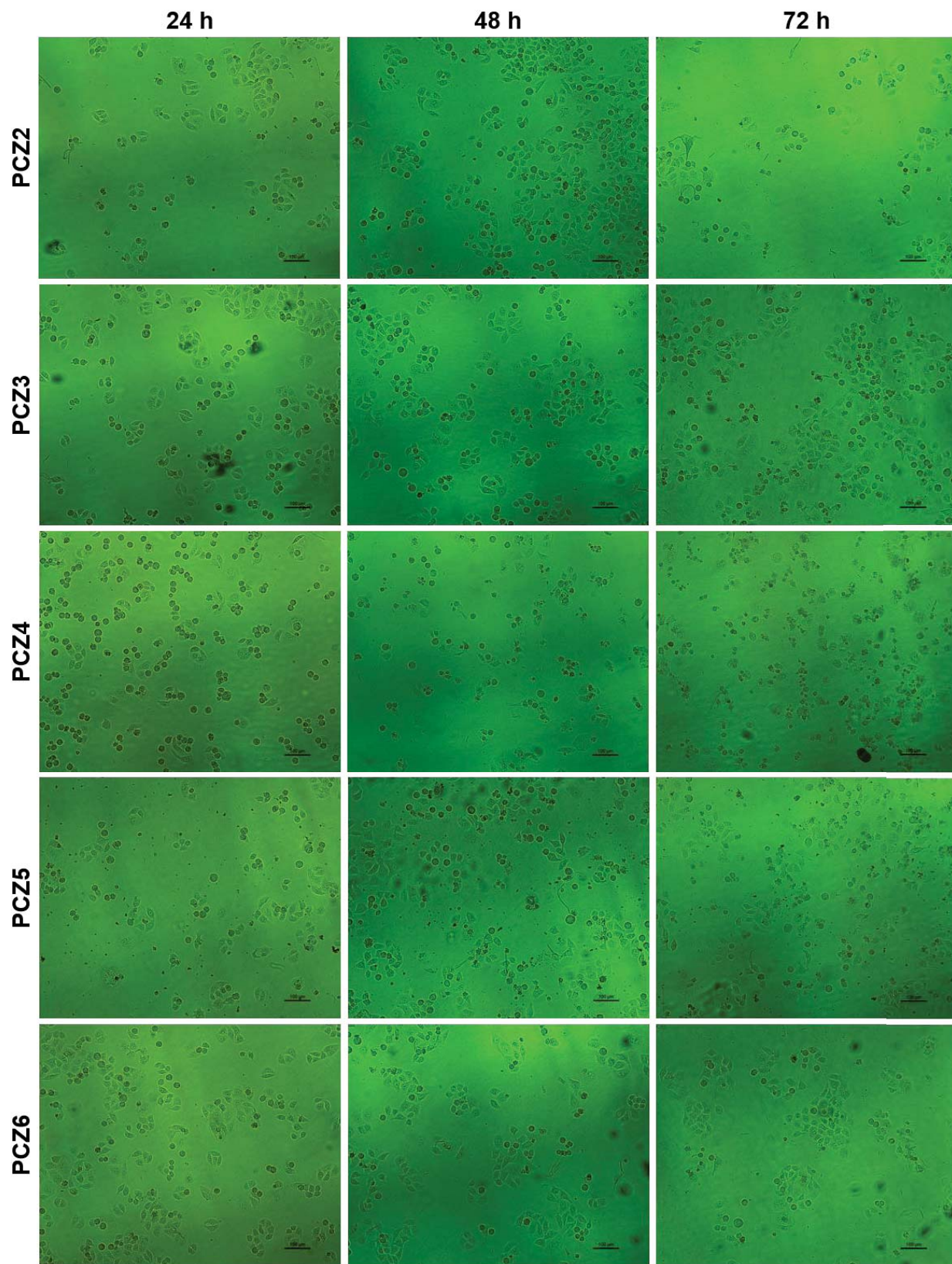


Figura III.2.2. Cambios morfológicos en las células SK-LU-1 bajo los tratamientos: PCZ2 (19.4 μ M), PCZ3 (15.3 μ M), PCZ4 (11.7 μ M), PCZ5 (41.3 μ M) y PCZ6 (50 μ M), a su respectiva CI_{50} durante 24, 48 y 72 h.

III.3. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando la β -tubulina

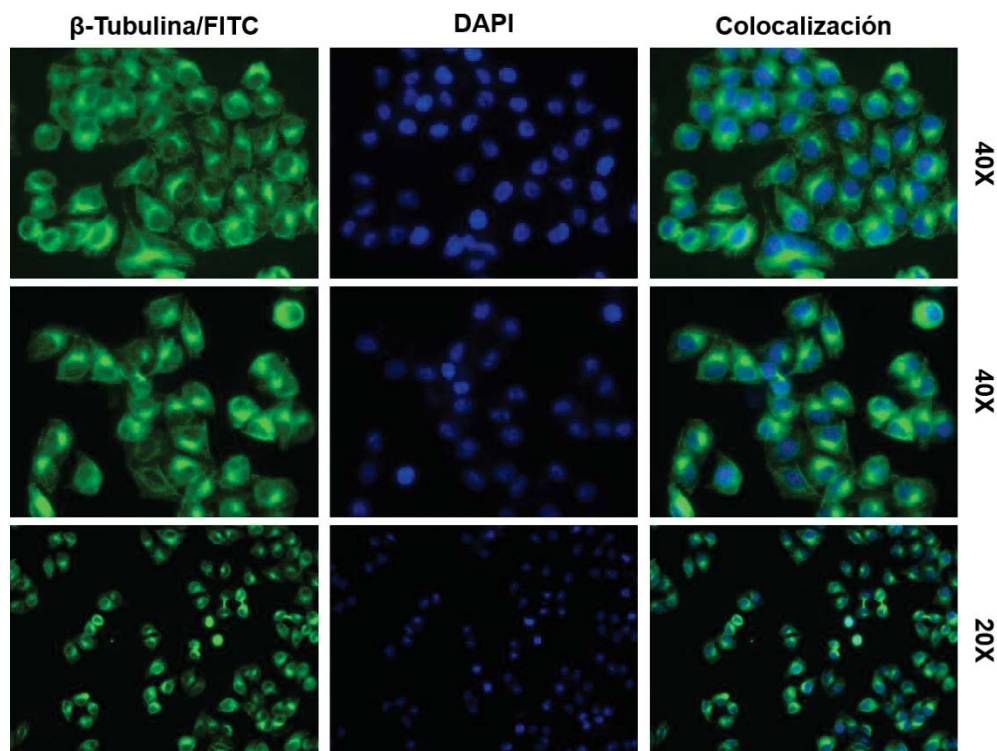


Figura III.3.1. Distribución normal de la β -tubulina en las células SK-LU-1 no tratadas.

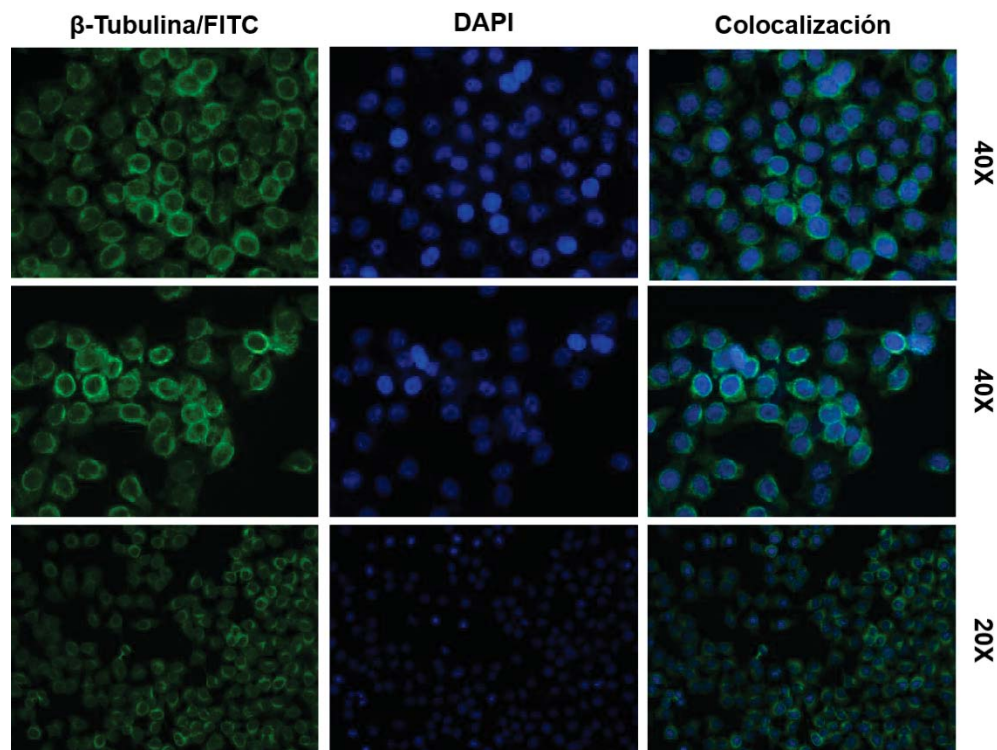


Figura III.3.2. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con NZ (0.08 μ M) a su CI_{50} durante 24 h.

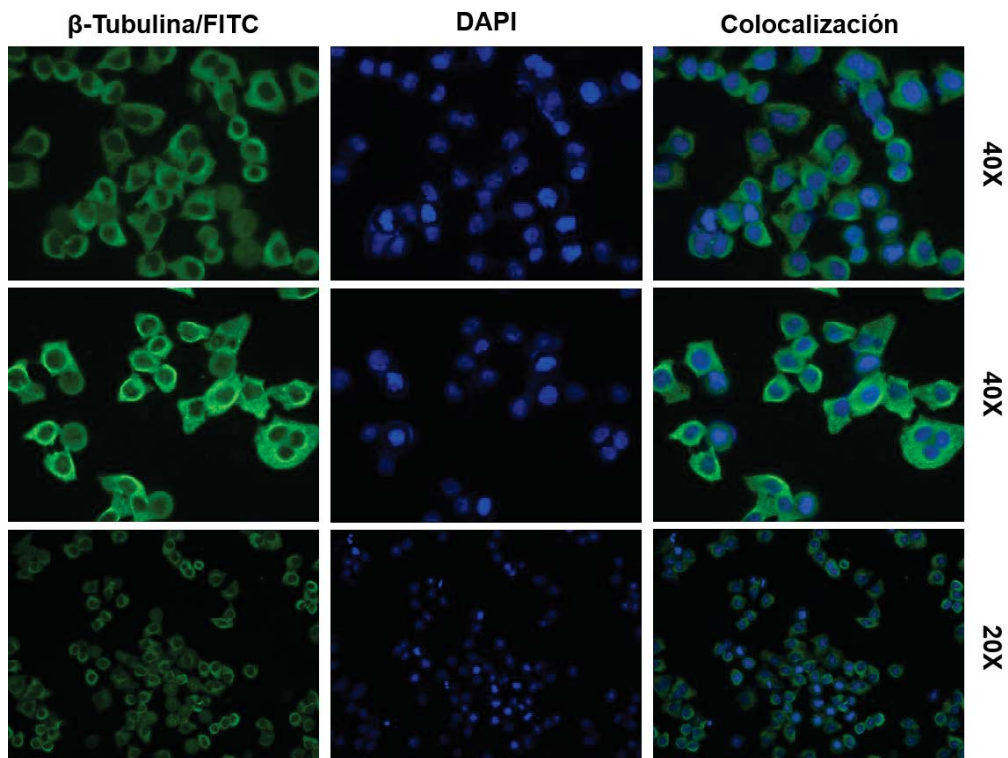


Figura III.3.3. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con LCG1 ($0.08 \mu\text{M}$) a su Cl_{50} durante 24 h.

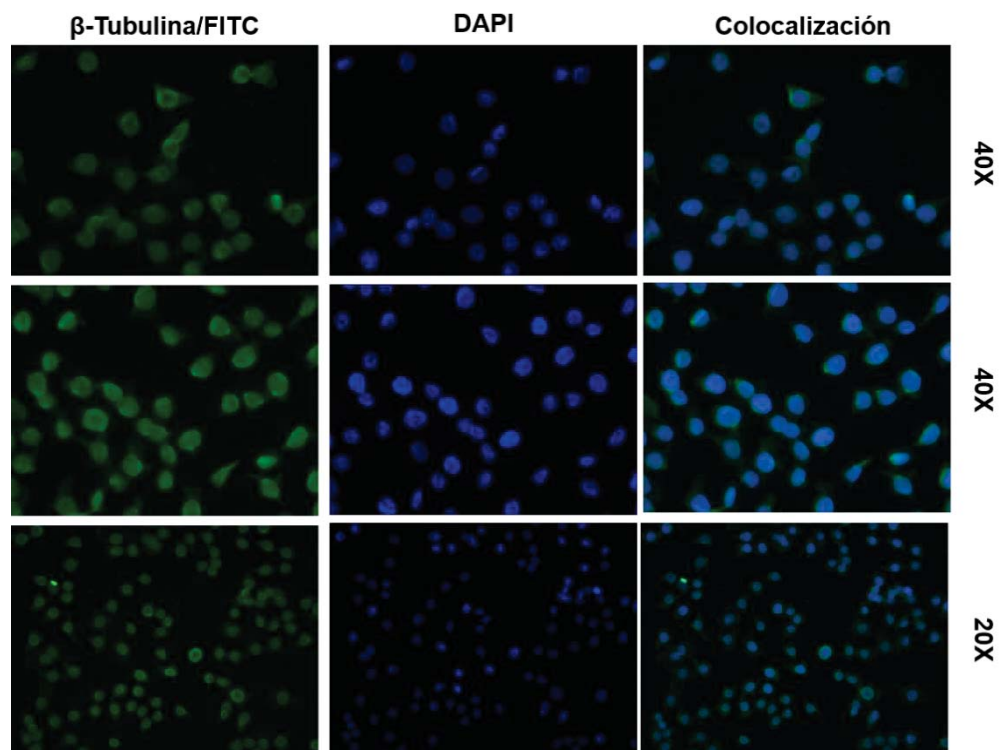


Figura III.3.4. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con PCZ1 ($46.9 \mu\text{M}$) a su Cl_{50} durante 24 h.

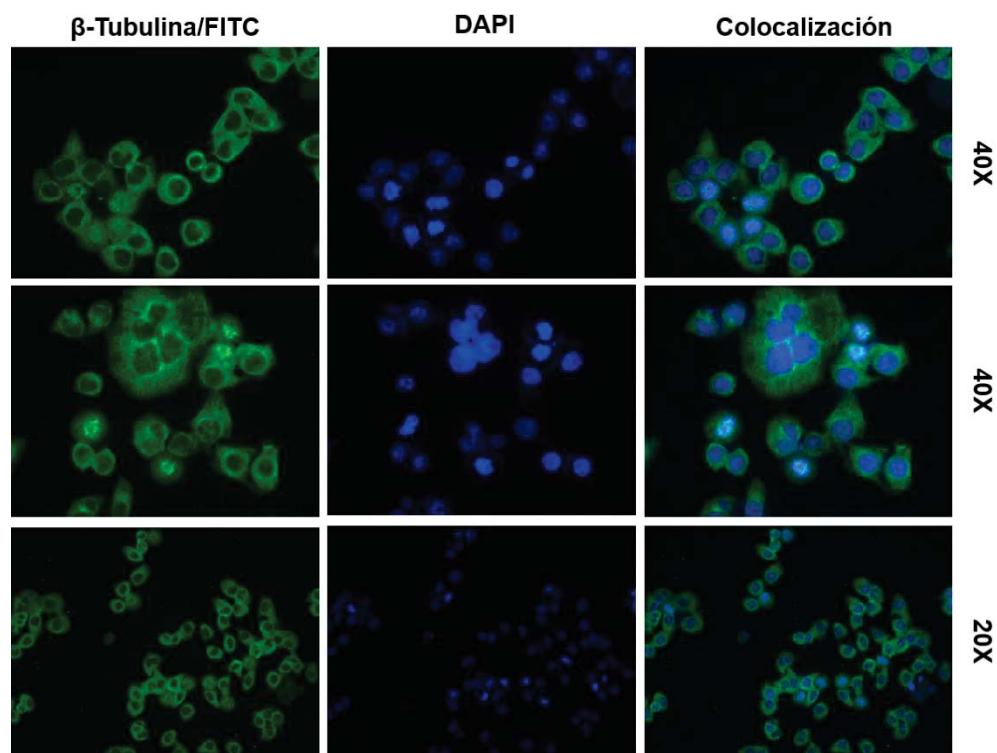


Figura III.3.5. Cambios en la distribución de la β -tubulina en células SK-LU-1 tratadas con PCZ4 (11.7 μ M) a su CI_{50} durante 24 h.

III.4. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta marcando la ciclina B

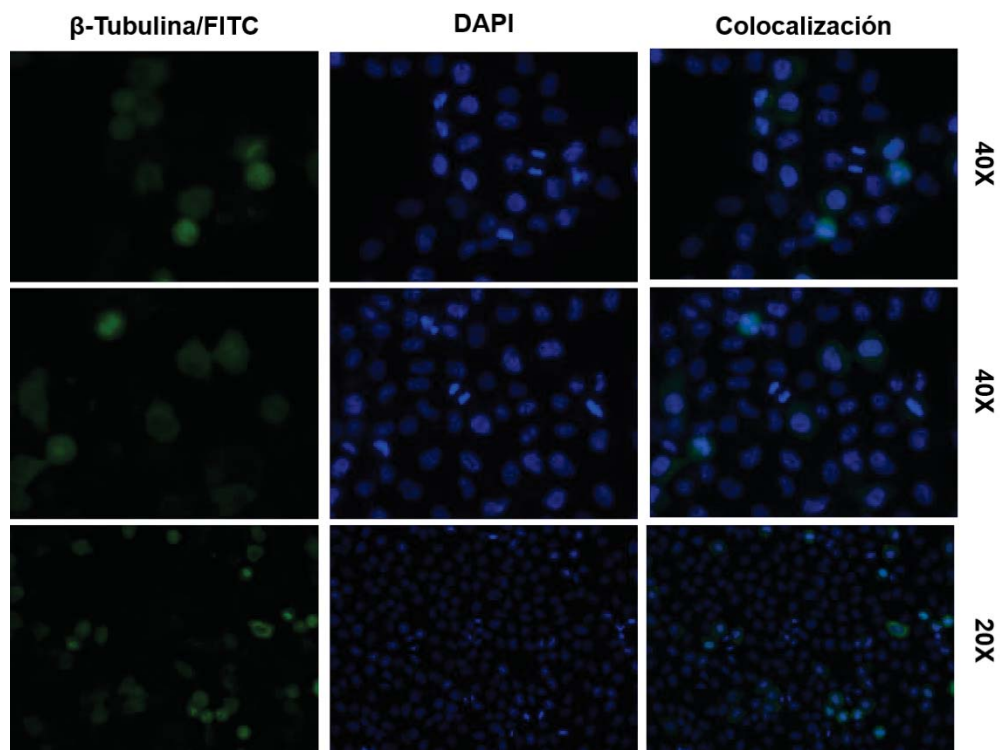


Figura III.4.1. Presencia de ciclina B en las células SK-LU-1 no tratadas.

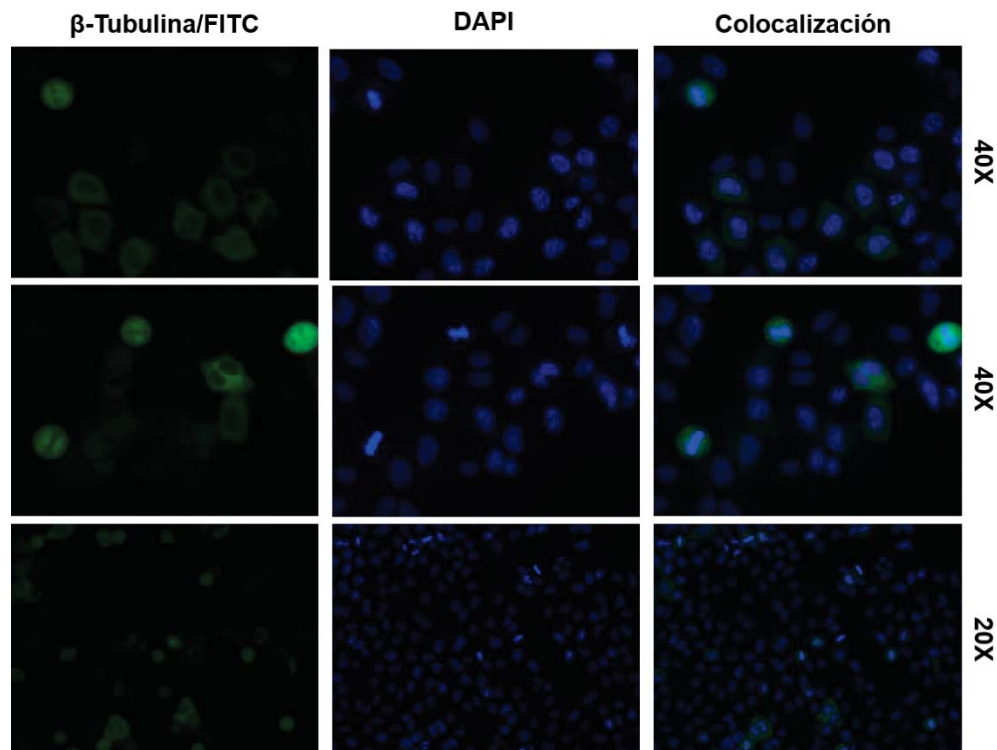


Figura III.4.2. Cambios en la presencia de ciclina B en células SK-LU-1 inducidos NZ (0.08 μ M) a su Cl_{50} durante 24 h.

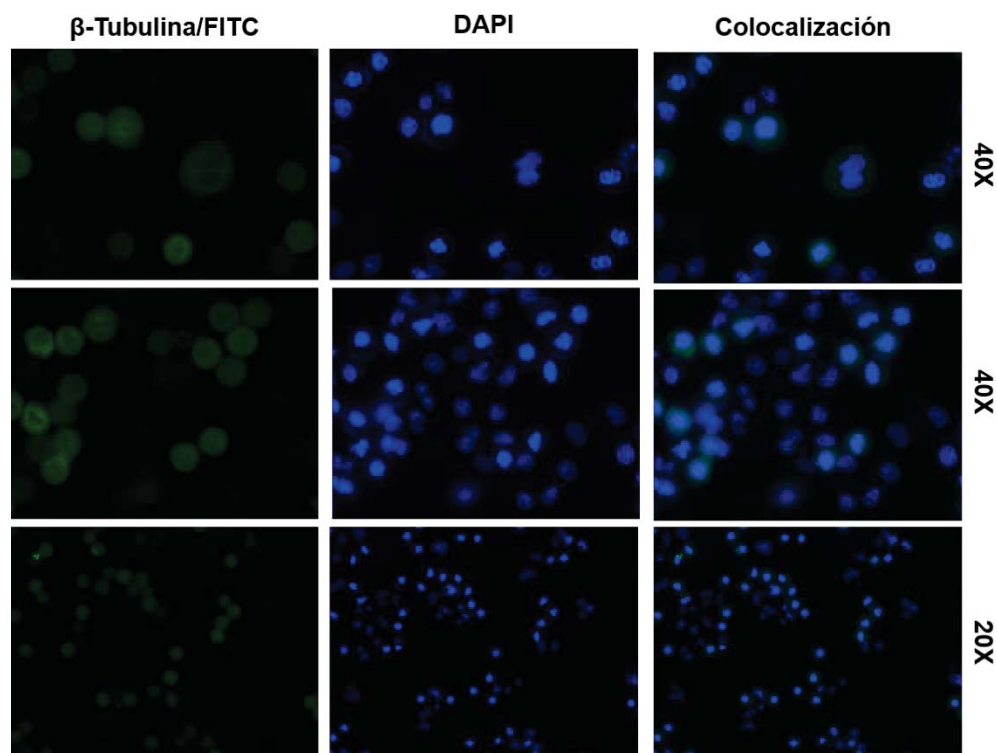


Figura III.4.3. Cambios en la presencia de ciclina B en células SK-LU-1 inducidos LCG1 (0.08 μ M) a su Cl_{50} durante 24 h.

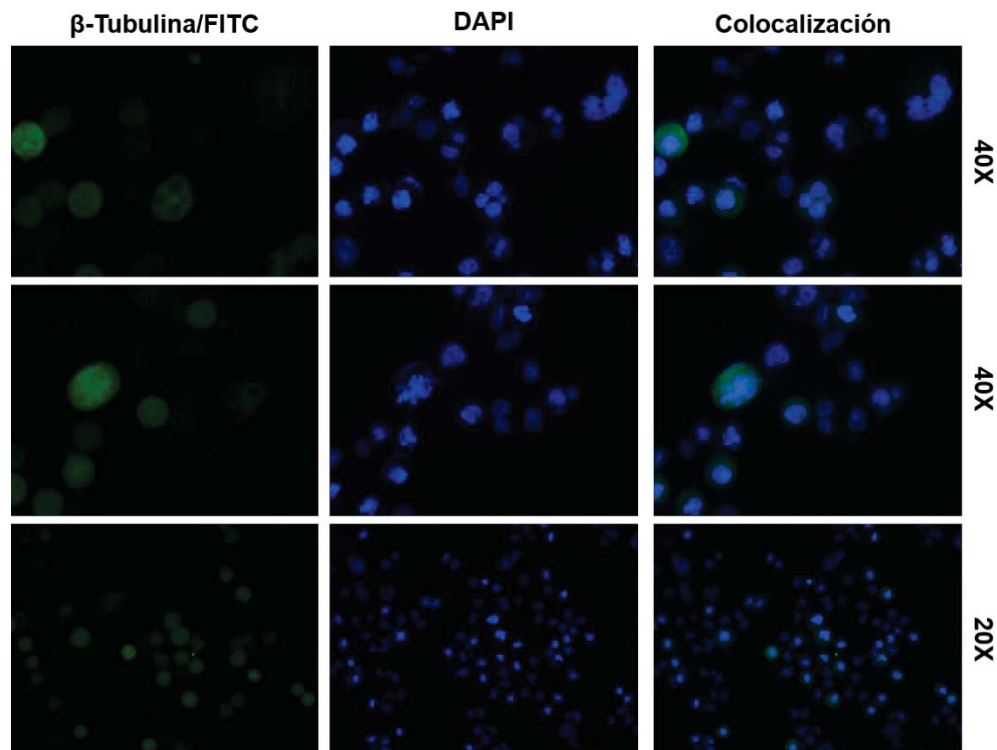


Figura III.4.4. Cambios en la presencia de ciclina B en células SK-LU-1 inducidos PCZ1 ($46.9\mu\text{M}$) a su Cl_{50} durante 24 h.

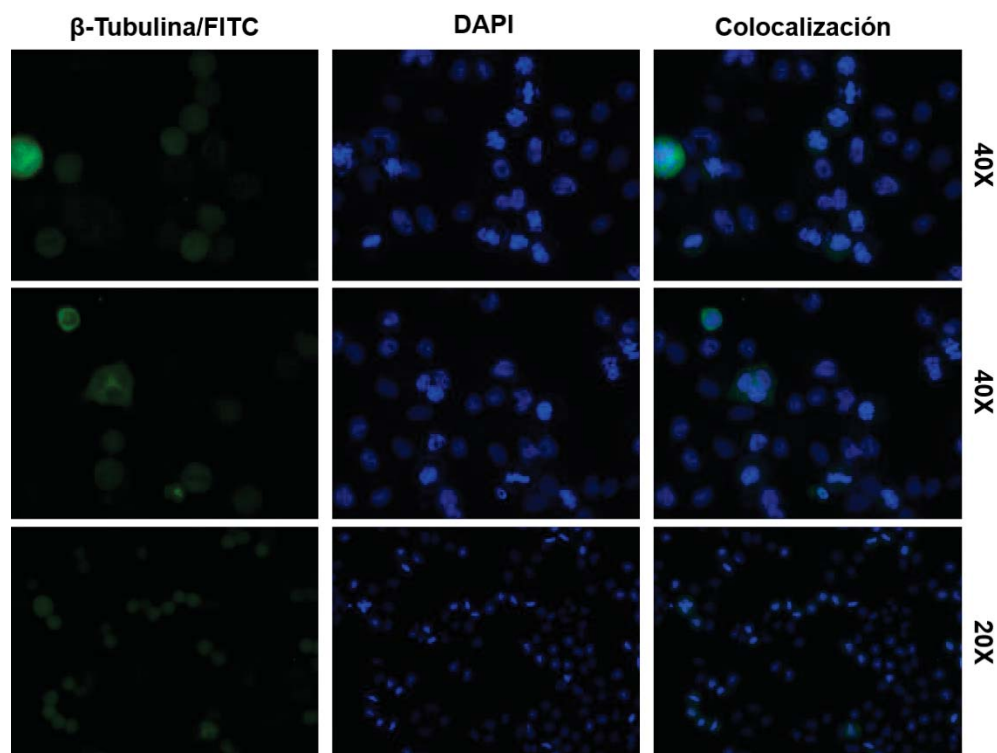


Figura III.4.5. Cambios en la presencia de ciclina B en células SK-LU-1 inducidos PCZ4 ($11.7\mu\text{M}$) a su Cl_{50} durante 24 h.