



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Evaluación *in vitro* de derivados de  
bencimidazol-2-carbamato de metilo  
como inhibidores de la polimerización de  
la  $\beta$ -tubulina humana**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ARIANA ROMERO VELASQUEZ**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Ignacio González Sánchez**



**Ciudad Universitaria, CD. MX.**

**AÑO 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:** Alicia Hernández Campos

**VOCAL:** Francisco Hernández Luis

**SECRETARIO:** Ignacio González Sánchez

**1er. SUPLENTE:** José Vergara de la Fuente

**2° SUPLENTE:** Marco Antonio Cerbón Cervantes

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Unidad de Investigación en Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología-Facultad De Química, Universidad Nacional Autónoma De México.

Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria, 04510, Ciudad de México, D.F.

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Ignacio González Sánchez

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

---

### **SUSTENTANTE:**

Ariana Romero Velásquez

---

*“Por eso este poema, tan abierto,  
como la mano en que se da la mano,  
es la desnuda tarde de verano  
en que la lluvia niega lo más cierto.*

*Si pudo lo increíble ser tan cierto  
y estar de lo más lejos tan cercano,  
que por eso, por ser eso  
está a la mano el agua incomparable del desierto.*

*Al abrir las ventanas de este día  
cerré los ojos  
cuando sonreía la flor de lo que pasa inesperado.*

*Por eso, cuando el sueño me despierta,  
desaparezco de uno y otro lado  
y me inclino a esperar que abran la puerta.”*

Carlos Pellicer

Tepoztlán, 4 de mayo de 1976

## **Dedicatoria**

A mi madre, Martha Velázquez, este trabajo es para ti.

En mi vida has sido como el Prometeo del famoso mural que inaugura el acceso a la antigua facultad de ciencias, aquel héroe impoluto que entregó la luz del conocimiento a una humanidad sumida en la oscuridad.

Parte del presente proyecto de tesis se presentó por el sustentante bajo la modalidad de cartel como parte de la celebración de la XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas, misma que se celebró en la ciudad de León, Guanajuato, del 17 al 20 de abril del año 2018.

## Agradecimientos

Expreso mi profundo agradecimiento a las instituciones y personas enlistadas a continuación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter, segundo hogar y la institución de la que me siento tan orgullosa de pertenecer. Estoy agradecida por haber contado con una formación académica de excelencia desde mi ingreso al bachillerato. Agradezco a todos aquellos profesores que, con su ardua dedicación y pasión, destinan desinteresadamente cientos de horas de cursos para cimentar en las mentes de los jóvenes estudiantes las bases del conocimiento necesario para el progreso de nuestra sociedad y nación. *Por mi raza hablará el espíritu.*

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones, agradezco el tiempo que gustosamente brindaron para el mejoramiento de mi tesis.

Al Dr. Ignacio González Sánchez por ser un profesionista tan completo y un gran líder en el ejercicio de demostrar pasión por la ciencia. Gracias por contagiarme continuamente de esa pasión e inculcar en mí un alto sentido de responsabilidad crítica. Gracias por toda la paciencia, los consejos, las observaciones y las horas de atención brindadas.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por recibirme tan afectuosamente en su equipo de investigación, por todo el apoyo brindado; la constante e inmejorable confianza que siempre depositó en mí, y por sus atinados consejos y observaciones.

A la M. en C. Lucia Cano González. Gracias infinitas por esa preocupación auténtica que siempre manifestaste en el desarrollo de mi formación académica y profesional, por la confianza, paciencia, consejos, tu entusiasmo y por el cariño que me has brindado. Gracias a ti he desarrollado notablemente mi capacidad autocrítica; y éste es, sin duda, el mejor bien que alguien me ha otorgado. Gustosamente puedo referirme a ti como una excelente Maestra y una gran asesora. Gracias por todo Lucy, te quiero.

Al Dr. Félix Matadamas Martínez y la Dra. Lilián Yépez Mujia, de la unidad de investigación médica en enfermedades infecciosas y parasitarias del hospital de pediatría CMN siglo XXI, IMSS. Por todo el apoyo y asesoría brindados en la realización de esta tesis.

A la Dra. Alicia Hernández Campos y al Dr. Rafael Castillo Bocanegra por sus valiosas aportaciones y haberme mantenido motivada.

Al M. en C. Rodrigo Aguayo Ortiz por haber depositado su confianza en mis habilidades académicas y por abrirme las puertas hacia este apasionante proyecto de investigación.

A los compañeros del laboratorio F-206 que siempre estuvieron allí para motivarme y que nunca dudaron en ofrecerme su amistad, confianza, y apoyo. Me refiero a ustedes: Paola González, Brenda Hernández, Carlos Páez, Isabel Coronado, Nadia Rivero, Alejandra Cabrera, Ofelia Limón, Luis Hernández, Gladys Molina, Kenia Morales, Mariana, Valeria, Carla, Irene, Juanita. A todos, ¡Gracias infinitas!

A aquellos compañeros que compartieron conmigo tardes hermosas en la facultad o largas horas de estudio: Lulú, Judith, Fanny, Vicky, Esdras, Fer, Jair, Cris, Mayra, Memo, Katia, Karlita, Mario, Karen, Pablo, Rubén, Diana, Andrés, Consuelo, Dany, Moni, Richard, Reza.

En especial y muy afectuosamente a continuación agradeceré a los amigos que hice durante la licenciatura ¿Qué habría sido de mi estancia en la máxima casa de estudios sin ustedes? Cada uno me ha llenado el pecho de experiencias hermosas, de apoyo y cariño, consejos, desvelos, horas de estudio y risas interminables. ¡Los quiero tanto! Me gusta pensar que la universidad ayudó a forjar mi juicio profesional y parte de mi criterio analítico, pero ustedes, queridos hermanos, me ayudaron a moldear mi fuerza y espíritu.

A Liliana Santos Ferro. Te quiero a mares, amiga mía. Contigo he aprendido tanto y mi pecho siempre está tan lleno de flores por ti, que estas simples palabras escritas no te hacen justicia. ¡Gracias!



A Carla Castillo y Jey Hernández por llenarme de inspiración y hacerme comprender que la amistad late igual que los corazones de las aves. Comprendo perfectamente que en ustedes puedo contar siempre, tan solo espero que ustedes sepan que mi mano siempre se extenderá abierta y plenamente para ambos. Los amo.

A Guillermo González por compartir junto a mí gratos momentos intelectivos y reflexivos sobre la fragilidad de la existencia humana. Te quiero mucho, negro.

A Estefanía Antonieta Carrillo Velázquez gracias por todo tu cariño y confianza. Eres una gran persona y cada día me inspiras a convertirme en la mejor versión de mi propia persona. Te quiero.

A Lilian O. Cervantes, ya no sólo por ser como una hermana para mí, sino también por haberme confiado un cachito de tu alma. Gracias por permitirme crecer a tu lado, por tu sinceridad, sencillez, el asombroso gusto musical que te caracteriza; y sobre todo, gracias por tratarme como a uno más de tus estudiantes y brindarme la oportunidad de aprender de mis propios errores.

A Karol Almeida Aguirre por aquella gloriosa tarde con la impresora. Porque somos hermanas de la noche; y ya se sabe, con regularidad sucede que nuestros corazones se agitan con el viento de la tempestad a la que normalmente llaman Juventud. Perfectamente comprendo que cuento contigo incondicionalmente, ¿Comprendes tú que cuentas conmigo también? Eres una persona transparente y yo daría lo que fuera por verte sonreír.

A las MANAs, Mariana, Alejandra, Natalia y Anaiza, por haberme traído la luz del cielo. Quiero que se queden con lo mejor de mí e ignoren aquellos momentos en los que he mostrado falta de carácter y entereza. Como saben, yo siempre quiero llenarlas de abrazos y besos porque gracias a ustedes ya no me siento sola entre inmortales eminencias del conocimiento.

A Praxedes por aquellas lecciones de teclado. Cuando me encuentro en tardes solitarias como las de hoy mi templanza me permite comprender qué; aunque con frecuencia los caminos de la juventud son agitados, siempre existe

entre nosotras algo que es hermoso y digno de rescatar. Te quiero, y no sólo eso, sabes que también deseo que seas feliz.

A Emma, Adelita, Gaby, Uriel, y a Raúl. Por haberme hecho vivir tardes llenas de dicha.

Y finalmente a aquellas personas que siempre llevo en el corazón, pero desafortunadamente, no siempre en mi despistada memoria.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
2.1 CÁNCER	4
2.1.1 Definición e incidencia	4
2.1.2 Desarrollo	5
2.1.3 Tratamiento	7
2.2 MICROTÚBULOS	9
2.2.1 Relevancia en la regulación celular	9
2.2.2 Estructura	9
2.2.3 Equilibrio dinámico de los microtúbulos	11
2.3 ISOFORMAS DE $\beta$ -TUBULINA	13
2.4 AGENTES QUÍMICOS DE UNIÓN A LA TUBULINA	15
2.4.1 Agentes estabilizadores de la polimerización	16
2.4.2 Agentes desestabilizadores de la polimerización	17
2.5 CARBAMATOS BENCIMIDAZÓLICOS	19
2.5.1 Carbamatos bencimidazólicos de la serie LCG	22
2.6 MODELOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO DEL CÁNCER	24
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>26</b>
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>5 HIPÓTESIS</b>	<b>27</b>
<b>6 METODOLOGÍA</b>	<b>28</b>
6.1 Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares	28

6.2	Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica	28
6.3	Determinación de la $CI_{50}$ en las líneas celulares	29
6.4	Ensayo de inmunofluorescencia directa	29
6.5	Polimerización <i>in vitro</i> de la tubulina	30
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
7.1	Actividad citotóxica de los CBZ en líneas celulares SK-LU-1, SW620 y MCF7	31
7.2	Cambios morfológicos de las líneas celulares SK-LU-1 y SW620	38
7.3	Actividad citotóxica de la serie LCG en células mononucleares de sangre periférica	41
7.4	Ensayo de inmunofluorescencia directa	45
7.5	Polimerización <i>in vitro</i> de la tubulina	48
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>52</b>
<b>10</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXOS</b>	
<b>I</b>	<b>CARTEL</b>	<b>65</b>
<b>II</b>	<b>ESTRUCTURA DE LOS DERIVADOS BENCIMIDAZÓLICOS</b>	<b>66</b>
<b>III</b>	<b>CULTIVO CELULAR</b>	<b>68</b>
	Preparación de soluciones	68
	Descongelamiento de células	71
	Lavado y desprendimiento de células	71
	Congelamiento de células	72
	Conteo en cámara de Neubauer	73
	Cultivo en placas de 96 pozos	74

Administración de tratamiento	75
Determinación de la viabilidad celular	77
Obtención de leucocitos de sangre periférica	78
<b>IV INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA</b>	<b>80</b>
Lavado de cubreobjetos	80
Siembra en placas de cultivo	80
Tinción directa	81
<b>V POLIMERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA TUBULINA</b>	<b>83</b>
Configuración del equipo instrumental	83
Procedimiento experimental	83
Esquema de dilución de los compuestos de interés	84

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Fármacos aprobados por la FDA	8
Tabla 2.2. Distribución normal de las isoformas de $\beta$ -tubulina	14
Tabla 2.3. Expresión de las isoformas de $\beta$ -tubulina en cáncer	14
Tabla 2.4. Sustituciones que favorecen la actividad antitumoral	21
Tabla 2.5. Estructura de la serie LCG	22
Tabla 2.6. Resultados del acoplamiento molecular de los CBZ	24
Tabla 2.7 Características de las líneas celulares empleadas	25
Tabla 7.1. Actividad citotóxica a 72 h h para los fármacos de referencia	31
Tabla 7.2. Actividad citotóxica de los CBZs a 72 h	32
Tabla 7.3. Resultados preliminares en células mononucleares	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura de los microtúbulos	10
Figura 2.2. Inestabilidad dinámica de los microtúbulos	12
Figura 2.3. Representación esquemática del heterodímero $\alpha/\beta$ tubulina	16
Figura 2.4. Sitios de acoplamiento en la estructura cristalizada $\alpha/\beta$	20
Figura 2.5. Componentes estructurales de la serie LCG	23
Figura 7.1. Detalles estructurales de los derivados LCG1 y LCG5	34
Figura 7.2. Detalles estructurales de los derivados LCG2-4 y LCG6	35
Figura 7.3. Cambios morfológicos en la línea celular SK-LU-1	39
Figura 7.4. Cambios morfológicos en la línea celular en SW620	40
Figura 7.5. Actividad metabólica del cultivo primario de leucocitos	42
Figura 7.6. Cambios en la distribución de $\beta$ -tubulina de células SK-LU-1	45
Figura 7.7. Efectos en la cinética de polimerización de la tubulina	49
Figura I. Representación del sistema de esterilización por filtración	70
Figura II. Representación esquemática de la cámara de Neubauer	73
Figura III. Administración del tratamiento en placa de 96 pozos	76
Figura IV. Reducción metabólica del MTT	77
Figura V. Aislamiento de leucocitos de sangre periférica	78
Figura VI. Representación esquemática de la tinción directa	81

## ABREVIATURAS

<b>ABZ</b>	Albendazol
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CBZ</b>	Carbamatos bencimidazólicos
<b>DAPI</b>	4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>D.E.</b>	Desviación estándar
<b>FBZ</b>	Fenbendazol
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración Inhibitoria 50
<b>LCG1</b>	<i>N</i> -[5-(naftil-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>LCG2</b>	<i>N</i> -[5-(quinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>LCG3</b>	<i>N</i> -[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>LCG4</b>	<i>N</i> -[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>LCG5</b>	<i>N</i> -[5-(4-cloronaftil-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>LCG6</b>	<i>N</i> -[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>MBZ</b>	Mebendazol
<b>MCF7</b>	Línea celular de cáncer de mama con el acrónimo <i>Michigan cancer foundation-7</i>
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<b>NZ</b>	Nocodazol
<b>PAF</b>	p-formaldehído
<b>PBS</b>	Solución Amortiguadora de Fosfatos
<b>PBS90</b>	<i>N</i> -[5-(2,3-diclorofenoxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SK-LU-1</b>	Línea celular de cáncer de pulmón con el acrónimo <i>Sloan Kettering lung-1</i>
<b>SW620</b>	Línea celular de cáncer de colon

## RESUMEN

En el presente proyecto de tesis se determinó la citotoxicidad de seis derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo en las líneas celulares SK-LU-1 y SW620. La serie de compuestos referida corresponde a seis derivados bencimidazólicos que se sintetizaron como inhibidores de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina. El derivado LCG1 resultó ser el más citotóxico de esta serie con un valor de  $CI_{50}$  aproximado a 0.08  $\mu$ M, tanto en la línea celular SK-LU-1 como en la SW620, adicionalmente se confirmó la capacidad de este compuesto de inducir cambios en la morfología epitelial de las líneas celulares estudiadas.

En un ensayo de inmunofluorescencia directa se determinó que el derivado LCG1 induce alteraciones en la distribución normal del ADN y la  $\beta$ -tubulina de las células SK-LU-1. Se sugiere que tales alteraciones se deben a la capacidad del compuesto LCG1 de producir el escape mitótico de las células, liderando de esta manera la formación de células multinucleadas.



# 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.<sup>1,2</sup> Tan solo en el año 2015 fue la segunda causa de muerte a nivel mundial y reportó 14 millones de nuevos casos y 8,8 millones de muertes.<sup>3</sup> Debido a esto, la búsqueda de nuevos tratamientos contra este padecimiento es de primordial importancia.

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados en la investigación de terapias efectivas y seguras para el tratamiento de los diversos tipos de tumores, las que se encuentran disponibles en la actualidad presentan graves problemas asociados con su alta toxicidad y baja biodisponibilidad.

Con la finalidad de brindar una alternativa a las terapias tradicionales, estudios actuales han propuesto como blanco terapéutico a los microtúbulos; los cuales son estructuras celulares formadas por el auto ensamblaje de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina, y se han convertido en dianas biológicas atractivas para el diseño de nuevas terapias químicas dirigidas porque intervienen en diversas funciones que son fundamentales en la estabilidad y supervivencia celular.

Con base en lo anterior, el grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo Bocanegra; quien es investigador adscrito a la Facultad de Química de la UNAM, realizó la síntesis de seis derivados de 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, cuyas características estructurales podrían favorecer su unión con la  $\beta$ -tubulina, alterando la dinámica normal de los microtúbulos y con esto aumentar la muerte de las células cancerígenas.

El presente trabajo de tesis se centró en determinar la citotoxicidad de la serie de derivados bencimidazólicos propuesta y analizar si estos tienen su mecanismo de acción a nivel de los microtúbulos. Para responder a esta pregunta, se planteó estudiar la citotoxicidad de los mismos empleando líneas celulares humanas de cáncer, y ensayos de inmunofluorescencia, con el fin de corroborar las predicciones obtenidas previamente en ensayos *in silico*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CÁNCER

#### 2.1.1 Definición e incidencia

El cáncer es una enfermedad provocada por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de un grupo de células que son capaces de invadir, localmente o a distancia, a otros tejidos; en consecuencia, el exceso de células da origen a masas de colonias celulares denominadas tumores.<sup>4,5</sup> No todos los tumores son cancerosos, algunos estos pueden ser benignos.<sup>5</sup> Las células en los tumores malignos presentan mutaciones que les permiten llevar a cabo una división desordenada, debido a que no obedecen a los controles normales de regulación en la proliferación, mecanismos de diferenciación celular, ni a los mecanismos naturales de muerte programada.<sup>4</sup>

De acuerdo con organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo.<sup>1,2</sup> Tan solo en el año 2015 fue la segunda causa de muerte a nivel mundial y reportó 14 millones de nuevos casos y 8.8 millones de muertes.<sup>6</sup> Los principales tipos de cáncer que ocurren a nivel mundial son: el pulmonar, hepático, gástrico, colorrectal, mamario y cáncer de esófago.<sup>6</sup>

También durante el año antes referido, en nuestro país, el cáncer fue la segunda causa de mortalidad.<sup>6,7</sup> De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), esta enfermedad registró alrededor de 6,400 muertes por tumores de próstata y 6,200 muertes por cáncer de mama.<sup>3</sup> Entre tanto, los datos de la OMS reportaron que los principales tipos de cáncer en hombres son los de próstata, tráquea, bronquios y pulmón; mientras que en mujeres, son los de mama, útero, ovario, hígado y de las vías biliares.<sup>1,6,8</sup>

### 2.1.2 Desarrollo del cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial lo cual significa que existen muchos factores involucrados en su aparición. La OMS establece que el consumo de tabaco y alcohol, una dieta no balanceada, así como la inactividad física son los principales factores de riesgo asociados a esta enfermedad. Sin embargo, en la actualidad diversos autores coinciden en que los factores genéticos y ambientales también actúan de forma combinada y secuencial durante el desarrollo del cáncer.<sup>1,2,4,7,9</sup>

Por lo anterior, se realiza la clasificación de los distintos agentes que promueven el desarrollo del cáncer en tres grupos: 1) sustancias químicas, 2) agentes físicos y 3) agentes biológicos.<sup>4,10</sup> Dentro de los agentes químicos pueden citarse a los agentes alquilantes del ADN y los contaminantes ambientales; entre los agentes físicos se encuentran los rayos X y la radiación UV; y, dentro de los agentes biológicos podemos citar al virus del papiloma humano.<sup>11</sup> A esta serie de agentes podrían añadirse los factores genéticos.<sup>12</sup>

Las mutaciones que contribuyen al desarrollo del cáncer pueden estar presentes en: I) proto-oncogenes, los cuales son genes que pueden convertirse en oncogenes, es decir, que promueven la proliferación celular; II) genes supresores de tumores, que detienen la proliferación celular y III) genes reparadores del ADN.<sup>4,10</sup> Además de las mutaciones, otras anomalías encontradas en las células cancerígenas son las traslocaciones, amplificaciones, deleciones, y ganancia o pérdida de cromosomas completos.<sup>10,13</sup>

El proceso por el cual se produce el cáncer se denomina carcinogénesis, y es ocasionado por anomalías en el material genético de las células que pueden ser originadas por los tres agentes etiológicos mencionados con anterioridad.<sup>5</sup>

La carcinogénesis se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, promoción y progresión, las cuales se definen a continuación.<sup>4,11</sup>

El proceso de *iniciación* se describe como la acumulación de mutaciones en una o varias células troncales, mismas que producen alguna modificación en su ciclo celular y desencadenan la resistencia a la apoptosis.<sup>11</sup>

La *promoción* se refiere al evento por el cual se produce la expansión clonal selectiva de las células iniciadas y complementa el desarrollo del cáncer. Esto se puede presentar a través de tres mecanismos que son: inhibición diferencial, estimulación diferencial y recuperación diferencial.<sup>12</sup>

La *progresión* se entiende como el conjunto de mutaciones adicionales que se producen de manera posterior a las adquiridas durante el proceso de iniciación. Estas mutaciones brindan ventajas selectivas a la célula, que son heredadas a su descendencia, en un proceso conocido como selección clonal.<sup>11,12</sup>

La aparente sencillez con la que es posible describir el desarrollo del cáncer en la actualidad podría sugerir que cualquier célula en nuestro organismo es capaz de sufrir una transformación maligna, sin embargo, es importante remarcar que esto no sucede así.

De acuerdo con Hanahan y Weinber,<sup>4</sup> la transformación maligna de las células normales ocurre de manera progresiva y es el resultado de la acumulación de factores específicos que desobedecen a los mecanismos antitumorales presentes en las células normales. Estos factores incluyen:

- 1) La adquisición de mutaciones que conducen a una transformación progresiva
- 2) Evasión de señales que detienen la proliferación
- 3) Capacidad ilimitada de replicación
- 4) Evasión de la apoptosis
- 5) Síntesis de factores de crecimiento
- 6) Evasión a la vigilancia del sistema inmune
- 7) Formación de nuevos vasos sanguíneos
- 8) Capacidad de diseminarse a un órgano distinto de su origen.

El desarrollo final del cáncer es el resultado de la acumulación de mutaciones que son originadas por eventos de naturaleza multifactorial<sup>13</sup> y resultan ventajosas para la proliferación sostenida, o bien, para la evasión de la muerte celular.<sup>7</sup> Por lo tanto, para que una célula sana se vuelva maligna es necesaria la acumulación o combinación estable de dos o más de estas mutaciones.<sup>4,7,9</sup>

### **2.1.3 Tratamiento del cáncer**

En la actualidad los principales tratamientos disponibles se clasifican en dos categorías, de acuerdo con su selectividad, como: terapias no selectivas y terapias dirigidas.<sup>2</sup> La selección de un tratamiento en concreto dirigido contra este padecimiento depende del tipo de cáncer a tratar y del grado de desarrollo que posea esta enfermedad.<sup>2,13</sup>

Las terapias no selectivas comprenden a la quimioterapia, radioterapia, y la cirugía, siendo esta última el tratamiento de primera elección en las etapas iniciales de un proceso cancerígeno.<sup>14</sup> Estos tratamientos tienen como objetivo controlar el crecimiento de las células cancerígenas o reducir los síntomas de la enfermedad.<sup>15</sup>

Aunque la cirugía sigue siendo de primera elección en las etapas iniciales, se trata de un procedimiento muy agresivo que no garantiza la eliminación de las células cancerígenas; lo cual podría permitir su supervivencia y posteriormente su proliferación.<sup>16</sup> Por otro lado, tanto la radioterapia como la quimioterapia, son terapias no selectivas actúan en contra de todas las células que se dividen, inclusive sobre las sanas.<sup>17</sup>

En cambio, las terapias dirigidas se caracterizan por su capacidad de producir la muerte celular selectiva de las células cancerígenas, de modo que son capaces de interferir con los mecanismos de crecimiento y propagación tumoral de las mismas, a través del aprovechamiento de la función de una diana biológica particular.<sup>18</sup> Para lograrlo, éstas pueden bloquear proteínas clave implicadas en rutas bioquímicas esenciales, o de proteínas mutadas implicadas en el crecimiento y supervivencia de las células cancerígenas.<sup>19</sup>

En la actualidad, se cuenta con un gran número de fármacos dirigidos a dianas biológicas específicas, algunas de ellas se muestran en la Tabla 2.1.2.

**Tabla 2.1.** Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer<sup>20,21</sup>

Diana	Fármaco	Mecanismo de Acción	Padecimiento
VEGF	Bevacizumab (Avastin®)	Anticuerpo monoclonal humanizado cuya unión a VEGF impide la interacción de este ligando con sus receptores (Flt-1 y KDR) en la superficie de las células endoteliales	Cáncer de mama, cuello uterino, ovario y colorrectal
Proteína de muerte celular programada-1 (PD-1)	Pembrolizumab (Keytruda®)	Fármaco-anticuerpo dirigido contra la proteína de superficie PD-1. Mediante la prevención de la unión de sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), el pembrolizumab induce una respuesta inmune antitumoral	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
Receptor estrogénico (ER- $\alpha$ )	Fulvestrant (Faslodex®)	Se une de forma competitiva y reversible a los receptores de estrógenos presentes en las células cancerígenas. Produce efectos anti-estrógeno a través de: 1) La regulación a la baja del receptor, y 2) La degradación del receptor	Cáncer de mama
Cinasas JAK-1 y JAK-2	Ruxolitinib (Jakafi®)	Inhibidor selectivo de las cinasas JAK1 y 2	Mielofibrosis
ADN	Azacitidina (Vidaza®)	Análogo químico del nucleósido citosina. De acuerdo con la dosis en que se administre puede producir inhibición de la DNA-metiltransferasa, hipometilación del ADN, y citotoxicidad	Síndrome mielodisplásico
Histonas	Vorinostat (Zolinza®)	Inhibe la actividad enzimática de las histonas desacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 (Clase I) y HDAC6 (Clase II)	Linfoma cutáneo de células T
Tubulina	Paclitaxel (Taxol®)	Su unión a la subunidad $\beta$ de la tubulina estabiliza la polimerización de los microtúbulos, alterando así la flexibilidad del citoesqueleto e impactando negativamente la funcionalidad normal de las células	Sarcoma de Kaposi, y cáncer de pulmón, ovario, mama
	Vinblastina (Velban®)	Se une a los microtúbulos del huso mitótico, lo cual conduce a la detención mitótica y posterior muerte celular	Cáncer de mama, testículo, pulmón, Linfoma Hodgkin

La tabla anterior reporta algunos fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) los cuales se encuentran actualmente disponibles en el mercado y presentan diferentes mecanismos de acción para el tratamiento de algunos tipos de cáncer.<sup>20</sup>

En la tabla anterior es posible observar que dos quimioterapéuticos tienen como diana celular a la tubulina, la cual es la principal proteína constituyente del citoesqueleto.<sup>22</sup> Tales fármacos son el paclitaxel y la vinblastina que son importantes en la actualidad debido a su amplio espectro de actividad contra las células neoplásicas.<sup>18,23</sup>

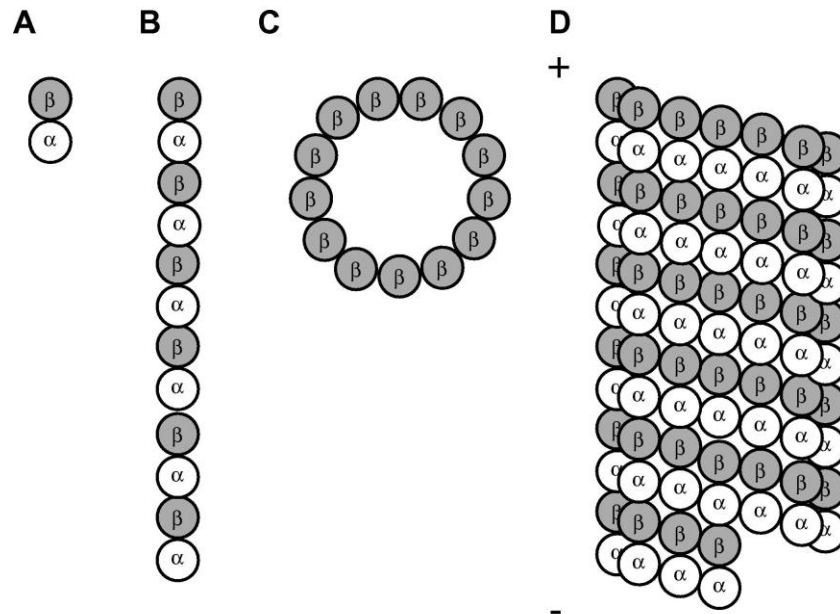
## **2.2 MICROTÚBULOS**

### **2.2.1 Relevancia de los microtúbulos en procesos de regulación celular**

Los microtúbulos son estructuras que constituyen el citoesqueleto de las células eucarióticas; están implicados en muchas funciones esenciales a lo largo del ciclo celular, como el transporte de material dentro de la célula, el movimiento y el progreso adecuado de la división celular.<sup>24</sup> En la actualidad, se ha confirmado que estas estructuras desempeñan un papel clave en la supresión de la proliferación de células tumorales.<sup>25,26</sup> Este conjunto de características las ha posicionado como dianas biológicas clave en el diseño de fármacos.<sup>27</sup>

### **2.2.2 Estructura de los microtúbulos**

Físicamente los microtúbulos tienen forma de cilindro hueco, y están conformados por heterodímeros estables de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Figura 2.1).<sup>28,29</sup>



**Figura 2.1.** Estructura de los microtúbulos. (Traducida de la referencia original).<sup>28</sup> (A) Los heterodímeros están compuestos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , que se polimerizan para formar (B) protofilamentos. Trece protofilamentos se asocian (C) y el contacto lateral entre éstos resulta en la estructura de los microtúbulos (D), con la subunidad  $\beta$  expuesta en la terminal positiva (+) y la subunidad  $\alpha$  en la terminal negativa (-).<sup>28,29</sup>

El heterodímero  $\alpha/\beta$  se asocia linealmente para formar protofilamentos; trece de éstos mantienen contacto lateral produciendo así la estructura característica del microtúbulo, cuyo diámetro externo es de aproximadamente 25 nm y posee una longitud variada. Esta estructura tiene una polaridad distinta en los extremos: la  $\beta$ -tubulina queda expuesta en la terminal positiva del microtúbulo, mientras la  $\alpha$ -tubulina se posiciona en la terminal negativa.<sup>22,30</sup>

Cada subunidad de tubulina contiene un sitio de unión para nucleótidos de guanosina (GTP/GDP).<sup>31</sup> El primer sitio se denomina sitio-N y se encuentra localizado en la subunidad  $\alpha$ , a este sitio se une una molécula de GTP de manera irreversible y no hidrolizable. El segundo sitio, denominado sitio-E, se localiza en la subunidad  $\beta$  y en éste se une una molécula de GTP que se puede hidrolizar. La hidrólisis es necesaria para el ensamblaje de los microtúbulos, como bien se describe a continuación.<sup>32</sup>



### 2.2.3 Equilibrio dinámico de los microtúbulos

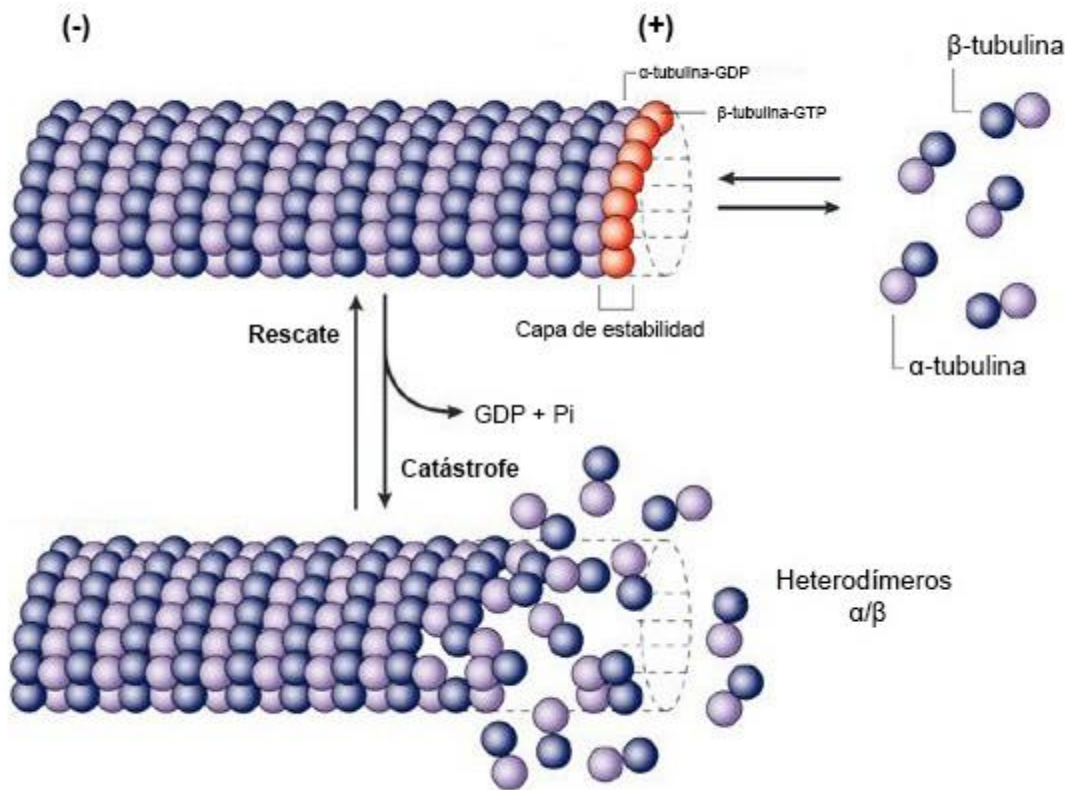
Los microtúbulos son altamente dinámicos para llevar a cabo algunas de sus funciones de manera correcta, como sostener un adecuado progreso de la división celular.<sup>27</sup> Debido a esto, continuamente alternan entre estados equilibrados de polimerización y despolimerización.<sup>33</sup>

Se sabe que los microtúbulos muestran al menos dos mecanismos distintos de comportamiento dinámico que se han observado tanto en sistemas *in vitro*<sup>34,35</sup> como *in vivo*<sup>36,37</sup>. Estos mecanismos son: 1) inestabilidad dinámica y 2) recambio rotatorio o *treadmilling*.<sup>24</sup> El primero ocurre a través de la adición y pérdida de subunidades de tubulina sobre la misma terminal del microtúbulo; mientras que el intercambio rotatorio involucra la ganancia de tubulina en el extremo positivo del microtúbulo y la pérdida de tubulina en el extremo negativo.<sup>27,38</sup> De los mecanismos anteriores, el proceso de inestabilidad dinámica es el más estudiado y descrito en la actualidad porque es un mecanismo que con frecuencia puede analizarse en estudios *in vitro*.<sup>30</sup>

La inestabilidad dinámica se caracteriza por alternar rápidamente entre estados de crecimiento y acortamiento en el extremo positivo del microtúbulo, este comportamiento es dirigido por la hidrólisis de GTP.<sup>30</sup> El proceso de crecimiento se denomina “catástrofe”, mientras que a la transición inversa se le denomina “rescate” (Figura 2.2).<sup>39,40</sup>

Cada subunidad de tubulina puede incorporar una molécula de GTP en su respectivo sitio de intercambio de nucleótidos; el GTP incorporado en el sitio-N no se hidroliza y se mantiene de forma constitutiva en la estructura, mientras que en el sitio-E se produce su hidrólisis. El GTP se hidroliza a GDP + Pi en el sitio-E de la  $\beta$ -tubulina (Figura 2.2).<sup>41,42</sup>

## Microtúbulo estable



## Microtúbulo despolimerizado

**Figura 2.2.** Dinámica de los microtúbulos. La hidrólisis de GTP dirige los eventos de catástrofe y rescate. (i) El ensamblaje de los microtúbulos inicia cuando cada subunidad de tubulina incorpora una molécula de GTP a su estructura. El GTP incorporado en la unidad  $\beta$  no se hidroliza y se mantiene de forma constitutiva en la estructura, mientras que en la unidad  $\alpha$  se produce su hidrólisis. (ii) La incorporación de GTP en la subunidad  $\beta$  produce una capa de estabilidad que favorece el crecimiento del microtúbulo. (iii) La pérdida de la capa de estabilidad conduce a una catástrofe donde los protofilamentos se abren hacia afuera y excluyen heterodímeros de tubulina en el citoplasma, durante el rescate, esta capa de estabilidad se reforma. (iv) Finalmente el GDP puede unirse a una subunidad  $\beta$  libre y puede intercambiarse por GTP para reiniciar el ciclo. Traducida de la referencia original.<sup>29,30</sup>

Se ha postulado que el extremo positivo mantiene una capa de estabilidad conformada por el complejo  $\beta$ -tubulina-GTP a lo largo del proceso de crecimiento; la pérdida de esta capa conduce a una catástrofe, mientras que durante los eventos de rescate esta capa se reforma.<sup>29,42</sup>

La hidrólisis del GTP produce un cambio conformacional en los microtúbulos. Cuando el complejo tubulina-GDP adopta una conformación curvada el proceso de adición de nuevas unidades de tubulina está desfavorecido para esta conformación, lo cual produce la apertura de los protofilamentos en el extremo positivo y desencadena el desmontaje de los microtúbulos.<sup>38</sup>

La despolimerización produce la exclusión de heterodímeros  $\alpha/\beta$ -tubulina en el citoplasma. El GDP se une a la  $\beta$ -tubulina libre y puede intercambiarse por GTP en el sitio-E, para reiniciar el ciclo.<sup>29,30</sup>

Interferir con el ensamblaje de los microtúbulos o con su equilibrio dinámico compromete gravemente la supervivencia de las células, debido a que los cambios estructurales en los microtúbulos normalmente se ven acompañados de la activación de mecanismos de muerte celular.<sup>24</sup> Sin embargo, dado que la dinámica de los microtúbulos es mayor en las células cancerígenas, éstos se han convertido en dianas biológicas clave en el diseño de fármacos contra el cáncer.<sup>27</sup>

### **2.3 Isoformas de la $\beta$ -tubulina**

Las isoformas de  $\beta$ -tubulina son codificadas por una familia de genes con un complejo patrón de expresión.<sup>43,44</sup> Estas isoformas se encuentran en diferentes niveles de expresión a través de células sanas en el cuerpo humano y se han observado cambios de expresión en muestras tumorales.<sup>43,45</sup>

La variación de las isoformas de la  $\beta$ -tubulina podría impactar considerablemente la capacidad de unión de un fármaco, debido a esto es importante analizar la distribución o expresión normal de dichas isoformas en el organismo.<sup>43,46,47</sup>

En la actualidad se han reportado al menos ocho isoformas de  $\beta$ -tubulina.<sup>44</sup> La Tabla 2.2 indica la distribución de estas isoformas en tejidos o células normales, mientras que la Tabla 2.3 resume el cambio de expresión en el mRNA de la  $\beta$ -tubulina durante un proceso cancerígeno.<sup>43</sup>

**Tabla 2.2.** Distribución normal de las isoformas de  $\beta$ -tubulina en tejidos humanos<sup>43</sup>

Isoformas	Gen	Tejido/Célula
$\beta$ I	<i>TUBB</i>	Expresión constitutiva (todos los tejidos)
$\beta$ IIa	<i>TUBB2A</i>	Neuronas, pulmón, páncreas, hígado, riñón, bazo, estómago y timo.
$\beta$ IIb	<i>TUBB2B</i>	Cerebro e intestino delgado
$\beta$ III	<i>TUBB3</i>	Neuronas y células de Sertoli
$\beta$ IVa	<i>TUBB4</i>	Cerebro, células de la glía
$\beta$ IVb	<i>TUBB2C</i>	Expresión constitutiva
$\beta$ V	<i>TUBB6</i>	Útero
$\beta$ VI	<i>TUBB1</i>	Médula ósea y células sanguíneas

**Tabla 2.3.** Expresión de las isoformas de la  $\beta$ -tubulina en tejidos cancerígenos<sup>43</sup>

Tipo de cáncer	$\beta$ I	$\beta$ IIa	$\beta$ III	$\beta$ IVb	$\beta$ V
Colon	↑	↓	↓	↓	↓
Mama	↑	↓	↑	≈	↓
Ovario	≈	↑	↑	↓	↓
Próstata	↓	↑	≈	↑	↓
Pulmón	↑	↑	↑	↓	↓
Riñón	↑	↓	≈	↓	↑

Nota: Los símbolos ↑ o ↓ indican, respectivamente, un incremento o decremento en el nivel de expresión de mRNA de las isoformas de  $\beta$ -tubulina en muestras de tejidos tumorales con respecto a tejidos sanos. El símbolo ≈ indica que no hay cambio significativo en la expresión.

Recientemente se ha reportado que existe una expresión aberrante de algunas isoformas de  $\beta$ -tubulina en diferentes tipos de tumores, en particular, la isoforma  $\beta$ III se ha asociado con resistencia a la quimioterapia.<sup>47,48</sup> En la actualidad la isoforma  $\beta$ III es un marcador biológico de relevancia clínica debido a que su presencia está asociada resistencia a la quimioterapia.<sup>49,50</sup>

Con base en lo anterior, y tomado en cuenta que existe una alterada o aberrante expresión de las isoformas de  $\beta$ -tubulina en el cáncer, el grupo de investigación del Dr. Rafael Castillo Bocanegra en la Facultad de Química UNAM, se enfocó en el diseño, la síntesis y la evaluación *in silico*, de seis derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo. Algunas características estructurales de esta serie de derivados podrían favorecer su afinidad a las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ III de la tubulina e interferir o inhibir la polimerización de los microtúbulos de las células cancerígenas.<sup>51</sup>

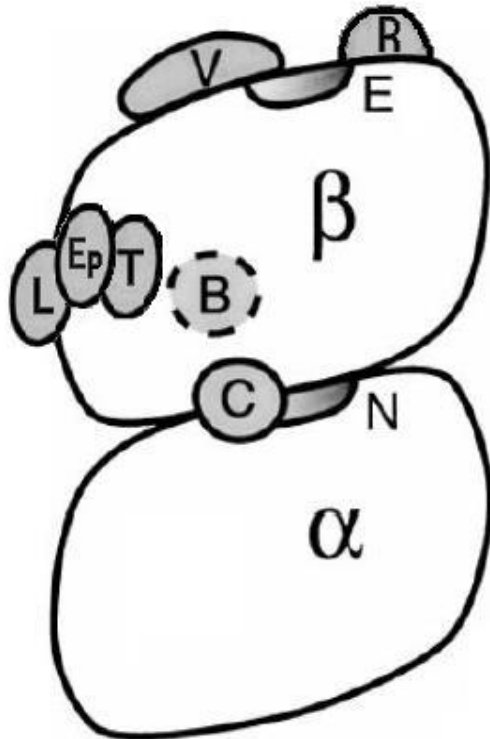
## 2.4 Agentes químicos de unión a la tubulina

La variedad funcional de los microtúbulos y su dinamismo han posicionado a estas estructuras como dianas novedosas en el diseño de fármacos. A continuación, se describe a un grupo de agentes cuyo mecanismo de acción depende de su unión con la tubulina.<sup>25,27</sup>

Los agentes que se unen a tubulina son compuestos de interés debido a que presentan afinidad por la subunidad  $\beta$  de la tubulina. Entre estos agentes es posible distinguir dos grupos de acuerdo con su mecanismo de acción: 1) agentes estabilizadores, y 2) desestabilizadores de los microtúbulos.<sup>52</sup>

Los agentes desestabilizadores inhiben la polimerización de los microtúbulos; en este grupo se han descrito compuestos tales como los alcaloides de la vinca, análogos a la colchicina, los carbamatos de bencimidazol (CBZ), y la rizoxina. El otro grupo corresponde a los agentes estabilizadores, los cuales promueven la polimerización de los microtúbulos, entre ellos se encuentran los taxanos, epotilonas, y laulimalida.<sup>22,33</sup>

Ambos grupos interfieren en el equilibrio dinámico de la polimerización de los microtúbulos mediante el bloqueo de la transición de metafase a anafase, lo cual ocasiona una detención mitótica y con ello la inducción de la apoptosis.<sup>52</sup> La Figura 2.3 corresponde a la representación esquemática del sitio de unión de estos agentes en el heterodímero  $\alpha/\beta$  de la tubulina.<sup>22,51,53</sup>



**Figura 2.3.** Representación esquemática de los sitios de unión al heterodímero  $\alpha/\beta$  de la tubulina.<sup>51</sup>

T: Taxol

V: Vinblastina

C: Colchicina

L: Laulimalida

R: Rizoxina F

Ep: Epotilona

[B]: Sitio de unión de los bencimidazoles

Sitios de unión de Nucleótido Intercambiable (E) y de Nucleótido No Intercambiable (N).<sup>51</sup>

#### 2.4.1 Agentes estabilizadores de la polimerización de microtúbulos: taxanos, epotilonas y laulimalida

- Taxanos

Los taxanos actualmente son empleados como tratamiento de quimioterapia para el cáncer de mama. Su sitio de unión se halla en la  $\beta$ -tubulina, y está revestido por residuos hidrofóbicos que permiten el acoplamiento de los taxanos en la cara interna de pared de los microtúbulos; muy próximo a este sitio se encuentra localizada el asa-M, la cual es una estructura que favorece el proceso de ensamblaje de los microtúbulos a través de la interacción de su núcleo con un segundo heterodímero de tubulina del protofilamento adyacente.<sup>28,50,53-55</sup>

- Epotilonas

Las epotilonas A y B se encontraron inicialmente en el organismo micobacteriano *Sorangrum cellulosum* como metabolitos secundarios con actividad citotóxica.

Se ha descrito que la epotilona B inhibe competitivamente al Taxol<sup>®</sup>, debido a que su sitio de unión es muy cercano al de los taxanos.<sup>23,28,31</sup>

- Laulimalida

La laulimalida y la pelorusida-A son macrólidos estabilizadores de los microtúbulos que fueron originalmente aislados de esponjas marinas. Actúan de manera sinérgica con el paclitaxel, porque estabilizan la polimerización mediante la estabilización alostérica del asa-M manteniendo a los protofilamentos en una conformación recta.<sup>45,53,56-59</sup>

#### **2.4.2 Agentes desestabilizadores de la polimerización de microtúbulos**

En este apartado se realizará la descripción de los agentes que ocasionan la inhibición de la dinámica de los microtúbulos y entre los que es posible citar a la colchicina, alcaloides de la vinca, rizoxina y los carbamatos bencimidazólicos.

- Colchicina

La colchicina es un alcaloide aislado del organismo *Colchicum autumnale*, y fue la primera sustancia identificada con capacidad de unirse a la tubulina. Inhibe la formación de los microtúbulos debido a que induce y fija un cambio conformacional curvo en los heterodímeros de tubulina, el cual es capaz de promover la despolimerización. Su sitio de unión se posiciona muy próximo al sitio-N en la interfase del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, aunque mantiene mayor interacción con la subunidad  $\beta$ .<sup>22,60</sup>

- Alcaloides de la vinca

Los primeros alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) se extrajeron de la planta *Catharanthus roseus*. La vincristina es el alcaloide representativo de este grupo y fue aprobada por la FDA como tratamiento quimioterapéutico en 1963.

Estos compuestos se unen a un sitio en la  $\beta$ -tubulina contiguo al sitio-E e interfieren con el crecimiento y el ensamblaje normal de los microtúbulos.<sup>22,31,58</sup>

- Rizoxina

La rizoxina es un macrólido biosintético cuyo sitio de unión, localizado de forma adyacente al sitio-E, está conformado por residuos hidrofóbicos y polares. La rizoxina es capaz de inducir un cambio conformacional que impide la agregación de más heterodímeros de tubulina. En la actualidad se cuenta con evidencia experimental donde se describe interferencia de la rizoxina con la unión de la vinblastina, lo que sugiere que estos compuestos compiten por el mismo sitio de unión.<sup>58,61</sup>

- Carbamatos Bencimidazólicos (CBZ)

Los CBZ tienen la capacidad de inhibir la polimerización de los microtúbulos,<sup>62</sup> y diversos autores han tomado esta propiedad como punto de partida para la realización de ensayos de inhibición de la viabilidad celular en algunas líneas celulares de cáncer. Hoy en día se acepta que los fármacos; albendazol (ABZ),<sup>63</sup> fenbendazol (FBZ),<sup>64</sup> mebendazol (MBZ)<sup>65</sup> y nocodazol (NZ),<sup>60,66</sup> son los principales CBZ con actividad antiproliferativa.

El NZ es el fármaco más activo del grupo antes descrito<sup>66</sup> y presenta actividad contra varios tumores y leucemias. El ABZ interfiere con el desarrollo de cáncer hepatocelular y colorectal,<sup>63</sup> aunque en algunos ensayos se ha confirmado que inhibe la proliferación de las líneas celulares malignas de dichos tipos de cáncer.<sup>67</sup>

Por otra parte, el MBZ ha demostrado potentes efectos antitumorales en células de cáncer de pulmón empleando ratones como modelo de estudio.<sup>68</sup> Finalmente el FBZ mostró actividad contra líneas celulares de cáncer de pulmón.<sup>63-66</sup>



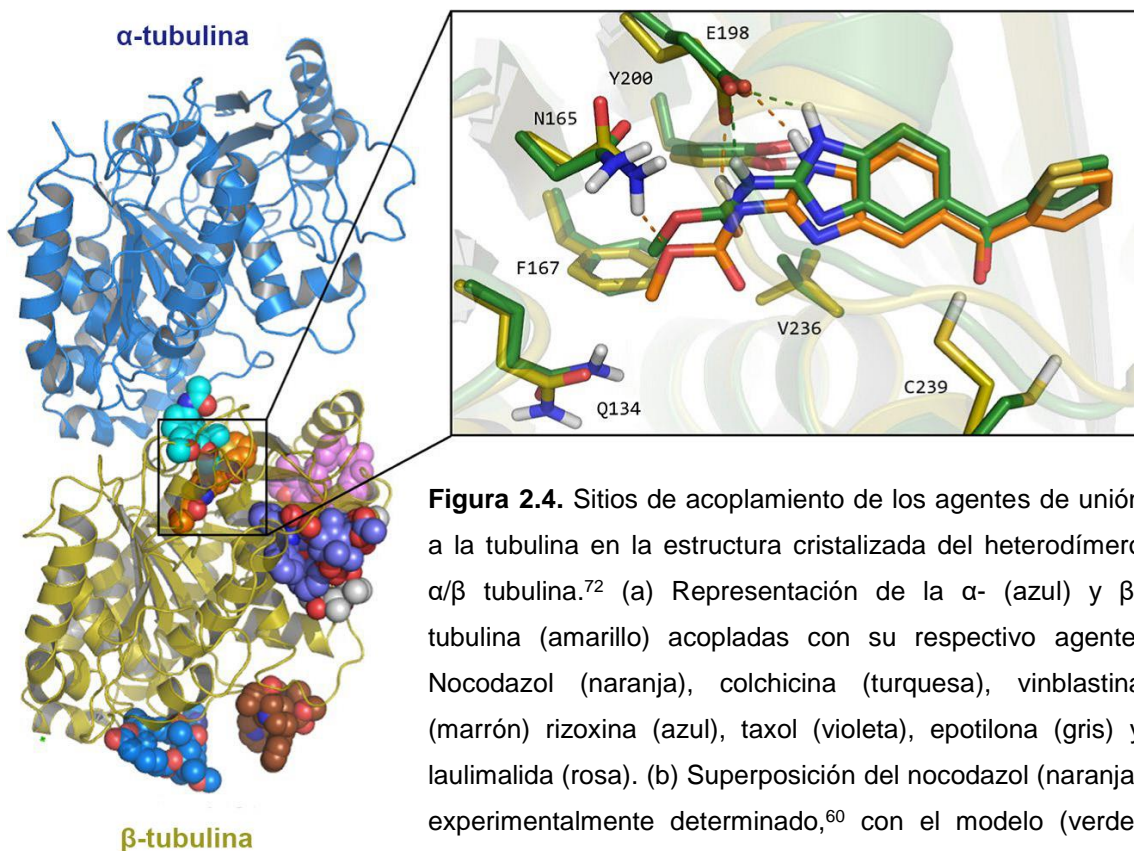
## 2.5 Carbamatos bencimidazólicos (CBZ)

Los carbamatos de bencimidazol son de gran interés debido a que recientemente se ha demostrado que son compuestos notablemente eficaces como agentes citotóxicos y antitumorales.<sup>63-66</sup>

El anillo de bencimidazol presente en los CBZ es un farmacóforo heterocíclico importante en el descubrimiento de nuevos fármacos quimioterapéuticos. Partiendo de este tipo de compuestos como estructuras prototipo es posible producir agentes quimioterapéuticos más selectivos, seguros y eficaces, a través de un proceso de optimización química.<sup>69-71</sup>

El grupo de investigación de la Dra. Laura Domínguez Dueñas, de la Facultad de Química, ha brindado estrategias esenciales para el desarrollo de terapias anticancerígenas basándose en los CBZ como estructuras prototipo. Dichos estudios proporcionan información relevante y actualizada sobre las características de la interacción sitio-específica de la  $\beta$ -tubulina con los CBZ.

A continuación se presentan algunos resultados obtenidos por el grupo de investigación antes referido comenzando por el análisis correspondiente al acoplamiento molecular o *docking*, de los agentes de unión a la tubulina en la estructura cristalizada del heterodímero  $\alpha/\beta$  (Figura 2.4).



Por otro lado, en la Tabla 2.4 se presenta un resumen de las características estructurales clave de los CBZ que están implicadas en su interacción con las isoformas de  $\beta I$  y  $\beta III$  de la tubulina.

Tomando como base la estructura del bencimidazol, los estudios de la relación estructura actividad (SAR) de los CBZ muestran que las características estructurales clave implicadas con su actividad antitumoral son las siguientes:

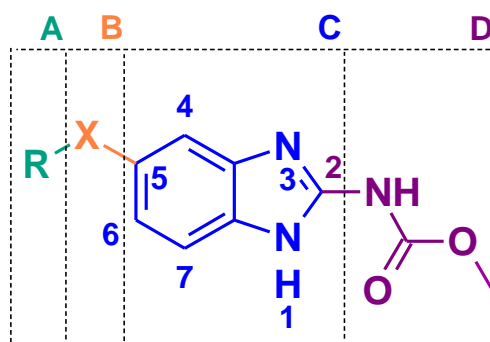
(A) Mediante interacciones hidrófobas se observa que los sustituyentes aromáticos mejoran la afinidad de unión de los compuestos en el sitio.

(B) Un aceptor de puente de hidrógeno se requiere como conector en la posición 5 del anillo de bencimidazol para la interacción con los aminoácidos Cys/Ser239.

(C) Se requiere un segundo puente de hidrógeno entre el núcleo de bencimidazol con Glu198 o Val 236.

(D) El puente de hidrógeno entre el grupo carbamato de metilo y los residuos Glu198 y Asn165 también es indispensable.<sup>51,72</sup>

**Tabla 2.4.** Sustituciones del núcleo del bencimidazol que favorecen la actividad antitumoral. Traducida de la referencia original<sup>72</sup>



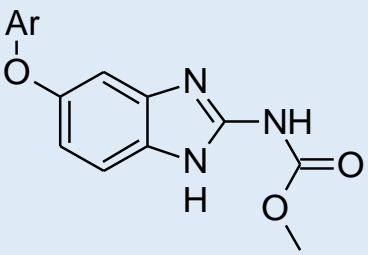
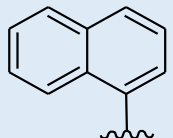
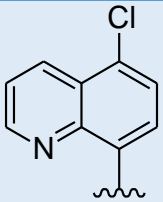
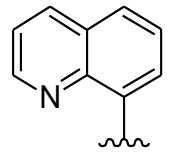
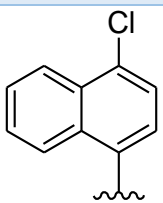
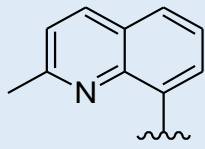
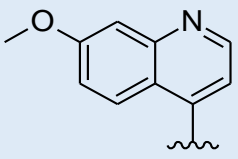
Región	Observaciones
A	Modificaciones en la posición 5 podrían ser útiles para mejorar la actividad biológica en nuevos derivados bencimidazólicos. Varios grupos aromáticos han sido estudiados para este propósito, por ejemplo, anillos bicíclicos aromáticos como fenilo, quinolina e indol, los cuales han presentado actividad biológica en diferentes líneas de cultivo celular. <sup>25,26,73</sup> Se ha observado que los grupos aromáticos presentan las energías libres de unión más estables tanto en la isoforma $\beta$ I como en $\beta$ III.
B	Un aceptor de puente de hidrógeno en la posición 5 puede aumentar la afinidad de los CBZ en el sitio de unión debido a una interacción con los aminoácidos Cys/Ser 239. Se sugiere que algunos compuestos con conectores como O, CO, S, SO o CONH podrían potenciar la actividad citotóxica.
C	El anillo de bencimidazol se considera la parte más importante de la estructura por dos razones: (1) es capaz de formar un puente de hidrógeno con el aminoácido Glu 198 tanto en la isoforma $\beta$ I como en la $\beta$ III y (2) el tautomerismo de este sistema heterocíclico podría tener una segunda posible interacción con el carbonilo de la cadena principal de Val 236.
D	El grupo carbamato de metilo de la posición 2 ha demostrado ser importante para la estabilidad del complejo proteína-ligando debido a la formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos en las posiciones Glu 198 y Asn 165, respectivamente. Un estudio experimental reciente reveló que el reemplazo del carbamato de metilo por sustituyentes de cadena más larga disminuye la actividad citotóxica. <sup>26</sup> Esta pérdida de actividad puede deberse al impedimento estérico entre los sustituyentes voluminosos y aminoácidos del sitio de unión, alterando así el modo de unión al ligando y la formación de puentes de hidrógeno que estabilicen la estructura.

Actualmente es necesario trabajar en la optimización de la actividad inhibitoria de los CBZ contra la  $\beta$ -tubulina de mamífero humano con el fin de potenciar las propiedades anticancerígenas de estos compuestos. Como posible solución a esta necesidad surge la serie LCG, sintetizada por el grupo de investigación antes referido, misma que corresponde a una serie de seis derivados de carbamatos bencimidazólicos que podrían presentar gran afinidad por la  $\beta$ -tubulina humana.<sup>51,72</sup>

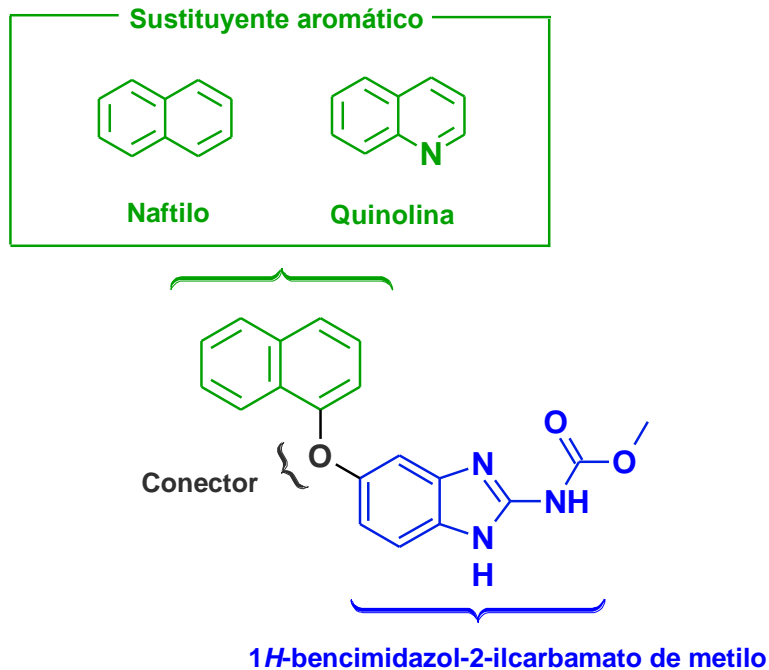
### 2.5.1 Carbamatos bencimidazólicos de la serie LCG

La serie de compuestos LCG corresponde a seis derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo que fueron diseñados originalmente como análogos de fármacos inhibidores de la  $\beta$ -tubulina de parásitos. En la Tabla 2.5 se presentan las estructuras de estos derivados.<sup>51,72</sup>

**Tabla 2.5.** Estructura de la serie de derivados bencimidazólicos LCG<sup>51</sup>

Núcleo	LCG	Ar	LCG	Ar
	1		4	
	2		5	
	3		6	

Estos compuestos presentan en su estructura tres componentes principales: 1) El núcleo 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, 2) un sustituyente aromático y 3) un conector entre ellos (Figura 2.5).<sup>51</sup>



**Figura 2.5.** Componentes estructurales de la serie LCG.<sup>51</sup>

La selección de los sustituyentes alrededor del núcleo del benzimidazol en la serie LCG se realizó tomando en consideración la relación estructura-actividad entre los CBZ y las isoformas de la  $\beta$  tubulina: El conector empleado corresponde a un átomo aceptor de puentes de hidrógeno, mientras que los sustituyentes aromáticos empleados en la síntesis de la serie LCG corresponden a los anillos de naftilo y quinolina, los cuales presentan propiedades antiproliferativas y antitumorales significativas.<sup>73-76</sup>

Adicionalmente se realizó un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos LCG y los fármacos: ABZ, FBZ y MBZ, en la  $\beta$ -tubulina modelada por homología a partir de la cadena D de la estructura cristalográfica PDB: 3N2G.<sup>51</sup> En la Tabla 2.6 se presentan los resultados de la energía libre de unión obtenidos. Los resultados que tienen mayor valor de energía libre de unión, indican una menor afinidad por el sitio, mientras que los de menor valor de energía presentan mayor afinidad.<sup>77</sup>

**Tabla 2.6.** Resultados del acoplamiento molecular de los CBZ<sup>51</sup>

Fármaco	Acoplamiento molecular en isoformas de $\beta$ -tubulina (kcal/mol)		
	$\beta$ I	$\beta$ III	$\beta$ VI
ABZ	-7.5	-7.72	-6.72
FBZ	-8.12	-8.51	-7.48
MBZ	-8.71	-8.8	-7.52
LCG1	-9.53	-10.17	-8.16
LCG2	-9.21	-9.72	-8.01
LCG3	-9.55	-9.96	-8.14
LCG4	-9.58	-10.01	-8.22
LCG5	-9.92	-10.46	-8.24
LCG6	-9.89	-9.67	-7.26
PBS90	-8.56	-9.03	-7.65

Los resultados obtenidos de esta predicción sugieren que la serie de compuestos LCG tiene buena afinidad por las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ III de la tubulina, las cuales se sobreexpresan en cáncer de pulmón, ovario y mama.<sup>43</sup> Por otro lado, también se sugiere que dicha serie exhibe baja afinidad por la isoforma  $\beta$ VI, la cual se expresa en células sanguíneas y su inhibición se ha asociado con la toxicidad hematológica.<sup>78,79</sup>

## 2.6 Modelos empleados en el estudio del cáncer

La investigación terapéutica del cáncer se encuentra en continua evolución de enfoques para descubrir, desarrollar e introducir nuevos agentes quimioterapéuticos. Dentro de los modelos de estudio disponibles es posible citar a los modelos basados en organismos no-mamíferos, tanto unicelulares como multicelulares, a los modelos basados en estudios computacionales y a los modelos *in vitro*.<sup>80</sup>

Las líneas celulares derivadas de tumores son empleadas en la actualidad para el estudio *in vitro* de procesos biológicos relacionados al cáncer. A diferencia de las células normales, estas líneas celulares presentan una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas características de los tumores primarios donde fueron originalmente aisladas. Debido a la gran variedad de cultivos existentes y a su relativa facilidad de manejo, las líneas celulares se han posicionado como excelentes modelos que permiten realizar amplios tamizajes en el descubrimiento y evaluación de la eficacia de nuevas terapias contra el cáncer.<sup>81,82</sup> A continuación se describen las características las líneas celulares seleccionadas para la realización del presente proyecto (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7.** Características de las líneas celulares empleadas en las evaluaciones de actividad biológica de los CBZ<sup>83</sup>

Línea celular	Organismo de origen	Tejido	Características culturales	Origen
SK-LU-1	<i>Homo sapiens</i>	Pulmón	Morfología epitelial, células adherentes	Adenocarcinoma pulmonar
SW620	<i>Homo sapiens</i>	Colon	Morfología epitelial, células adherentes	Adenocarcinoma colorrectal
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Glándula mamaria	Morfología epitelial, células adherentes	Adenocarcinoma de mama
Leucocitos*	<i>Homo sapiens</i>	Sangre periférica	Morfología esférica, células no adherentes	Células sanas (Cultivo celular primario)

\*NOTA: Los leucocitos empleados en los ensayos corresponden a un cultivo celular primario aislado de la sangre periférica de voluntarios sanos.

Considerando lo descrito hasta ahora resulta de gran importancia determinar la citotoxicidad de la serie LCG sobre las líneas celulares de cáncer señaladas en la Tabla 2.7 con el fin de confirmar las predicciones obtenidas en el modelo *in silico*, así como analizar el mecanismo molecular de acción de estos compuestos y determinar si éste involucra alteraciones en la dinámica de los microtúbulos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. De acuerdo con la OMS, en 2015 hubo alrededor de 14 millones de nuevos casos y 8.8 millones de muertes, además se prevé que el número de casos aumente aproximadamente un 70 % en los próximos 20 años.<sup>1,2</sup>

A pesar de los múltiples esfuerzos realizados en la investigación de terapias efectivas y seguras para el tratamiento de los diversos tipos de tumores, las que se encuentran disponibles en la actualidad, presentan graves problemas asociados con su alta toxicidad y baja biodisponibilidad.<sup>14,16</sup>

Como posible solución a esta necesidad surge la serie de derivados bencimidazólicos LCG, sintetizada racionalmente con base en modelos asistidos por química computacional por el grupo de investigación del Dr. Castillo Bocanegra; quien es investigador adscrito a la Facultad de Química de la UNAM.<sup>51,84-86</sup>

Esta serie de compuestos corresponde a seis derivados bencimidazólicos que podrían presentar gran afinidad por algunas isoformas de la  $\beta$ -tubulina que se sobreexpresan en tejidos cancerígenos, alterando así la dinámica de los microtúbulos y con esto aumentar la muerte de las células cancerígenas.<sup>43</sup>

La finalidad del presente proyecto de tesis es determinar si el diseño computacional de la serie LCG resultó exitoso en el sentido de producir agentes con actividad citotóxica mediada por su afinidad y unión a las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ III de la tubulina.



## 4. HIPÓTESIS

La serie de derivados bencimidazólicos LCG presentará actividad citotóxica. Estos compuestos serán capaces de inducir alteraciones en la dinámica normal de los microtúbulos a través de su unión con la subunidad  $\beta$  de la tubulina, de este modo, las células presentarán cambios morfológicos y será posible observar variaciones en la organización estructural de las mismas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 *Objetivo general*

Determinar la citotoxicidad de la serie LCG, así como analizar si dichos compuestos producen cambios en la morfología celular de líneas tumorales debido a la alteración en la dinámica normal de los microtúbulos.

### 5.2 *Objetivos particulares*

- Analizar la actividad citotóxica de la serie LCG, sobre líneas celulares SK-LU-1 de cáncer de pulmón, SW620 de cáncer de colon y MCF-7 de cáncer de mama.
- Determinar la  $CI_{50}$  de los derivados bencimidazólicos en las líneas celulares SK-LU-1, SW620, MCF-7 y en células mononucleares de sangre periférica.
- Comprobar si la serie LCG altera la distribución de los microtúbulos en un ensayo de inmunofluorescencia.
- Evaluar el efecto de los compuestos de la serie LCG sobre la inhibición de la polimerización de los microtúbulos en un ensayo *in vitro*.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares

La evaluación de los seis derivados y las referencias farmacológicas se realizó con el método de MTT. Se emplearon tres líneas celulares humanas de cáncer: SK-LU-1, SW620, MCF7 (Tabla 2.7), mismas a las que se les administró un esquema de tratamiento 0.01 a 10  $\mu\text{M}$ , tal como se detalla en la correspondiente sección de anexos experimentales, empleando DMSO como vehículo.

En una placa de 96 pozos se sembraron 4,000 células por pozo con medio DMEM (GIBCO-Invitrogen®) enriquecido con SFB al 10 %. Estas células se mantuvieron en reposo durante 24 h, posteriormente se incubaron durante 72 h en presencia de los tratamientos farmacológicos a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %.

Al finalizar el periodo de incubación se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT (2.5 mg/mL) a cada pozo y se mantuvieron así durante 1.5 h a 37 °C. Posteriormente, los cristales de formazán se disolvieron en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO y se determinó la densidad óptica empleando un lector de placas Epoch®, a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular y se calculó el valor de  $\text{CI}_{50} \pm \text{D.E.}$

### 6.2 Citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica

Empleando tubos con EDTA equipados con un sistema vacutainer (Becton Dickinson Vacutainer®, #367863) se obtuvo sangre periférica por venopunción de donadores adultos sanos en condiciones de ayuno. Para el aislamiento de leucocitos de las muestras obtenidas se empleó el sistema de separación Ficoll (Ficoll-Paque PLUS® GE Healthcare).

En microplacas de 96 pozos se sembraron 20,000 leucocitos por pozo con 200  $\mu\text{L}$  de medio RPMI-1640 (GIBCO-Invitrogen®) y 2.5  $\mu\text{g}$ /pozo de fitohemaglutinina (PHA-P Sigma Aldrich®), para promover la división celular. Estos cultivos se trataron con el compuesto LCG1 a una concentración final de

1.25, 2.5, 5, 7.5, 10  $\mu$ M empleando cisplatino como control positivo de citotoxicidad. Las células se incubaron durante 72 h a 37 °C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. Finalmente, se determinó colorimétricamente la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT antes descrito.

### **6.3 Determinación de la CI<sub>50</sub> en las líneas celulares**

Para obtener el valor de CI<sub>50</sub> de cada tratamiento se construyeron gráficos de viabilidad celular en función de la concentración del compuesto administrado. A partir del gráfico obtenido se realizó la determinación de la CI<sub>50</sub>  $\pm$  D.E. en el programa informático OriginPro® 7.0 mediante un modelo de regresión no lineal. Cada CI<sub>50</sub> reportada en el presente proyecto de tesis corresponde a la media aritmética de tres experimentos realizados de manera independiente.

### **6.4 Ensayo de inmunofluorescencia directa**

Se sembraron 45,000 células SK-LU-1 por caja Petri de 35 x 10 mm, las cuales contenían cubreobjetos circulares de 16 mm de diámetro previamente esterilizados por radiación UV durante 15 min. Las células se trataron con el vehículo DMSO, el fármaco NZ y el derivado LCG1; éstos últimos a una concentración equivalente a su respectiva CI<sub>50</sub>, durante 72 h bajo condiciones óptimas de cultivo celular.

Las células adheridas a los cubreobjetos circulares se fijaron químicamente añadiendo 1 mL de p-formaldehído al 4 % por caja Petri, durante 20 min a temperatura ambiente. El proceso de permeabilización de las células se realizó con una mezcla 1:1 de SDS y Triton X-100 (Aldrich®) al 0,5 % en PBS durante 10 min.

Posterior al paso de permeabilización, las células se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3 % en PBS durante 1 h. El proceso de inmunotinción se realizó empleando un anticuerpo monoclonal de clase IgG dirigido contra  $\beta$ -tubulina (GeneTex®, GTX11310); el cual, se diluyó 1:500 veces y

se incubó durante 1 h a 20 °C. La tinción de los núcleos celulares se realizó con una solución 1:500 de 4,6-Diamino-2-fenilindol (DAPI).

Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos limpios y desengrasados. La fluorescencia se protegió con 10 µL de la solución protectora Vecta-shield (Sigma-Aldrich®) diluida 1:500. La señal de inmunofluorescencia se detectó usando un microscopio de epifluorescencia BX41 (Olympus® Tokio, Japón).

### **6.5 Polimerización *in vitro* de la tubulina**

Con el kit comercial Cytoskeleton (Cytoskeleton Inc.® #BK006P) se realizaron curvas de polimerización de la tubulina siguiendo las indicaciones propuestas por el fabricante.

Este ensayo se realizó a partir de un stock de 200 µL de tubulina a una concentración de 10 mg/mL, la cual fue reconstituida en 420 µL de la solución amortiguadora de reacción contenida en el kit. Una vez reconstituida, la composición de la mezcla de reacción es de 3 mg/mL de tubulina en 80 mM PIPES, pH= 6.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP y 10 % glicerol.

El NZ y el derivado LCG1 se disolvieron en la solución amortiguadora a una concentración 10 veces mayor a la requerida en los pozos de reacción. Las concentraciones finales de cada compuesto en el ensayo fueron de 0.01-10 µM.

Se depositaron 10 µL de la solución 10 veces concentrada del tratamiento o 10 µL de control, en placas de 96 pozos de media área precalentadas a 37 °C y se mezclaron inmediatamente con 100 µL de la solución de tubulina a 3 mg/mL. Al término de un periodo orbital de mezclado de 5 s se realizó el seguimiento cinético de la polimerización, durante 1 h a 37 °C, realizando lecturas cada minuto a 340 nm en un lector de placas Epoch 2®.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Actividad citotóxica de los CBZ en líneas celulares SK-LU-1, SW620 y MCF7

En cuanto a la bioactividad que los compuestos heterocíclicos presentan, el anillo de bencimidazol destaca por presentar una gran diversidad de actividades que resultan de modificaciones exitosas realizadas alrededor de su región farmacofórica.<sup>70,87,88</sup> Los fármacos ABZ, FBZ, MBZ y NZ son derivados de bencimidazol que normalmente se emplean como agentes antiparasitarios.<sup>89,90</sup> No obstante, en la actualidad se sabe que este grupo de fármacos además es capaz de inhibir la proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer y por este motivo han sido seleccionados como compuestos de referencia a lo largo del presente proyecto de tesis.

En la Tabla 7.1 se presenta la recopilación de reportes de la actividad citotóxica de las referencias farmacológicas en determinadas líneas celulares tumorales, mismas que resultan interesantes porque corresponden a los tipos de cáncer con mayor índice de morbilidad a nivel mundial. Se señalan resultados sobre la actividad citotóxica determinadas a 72 h con el ensayo de MTT contra algunas líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón A-549, de colon SW480 y de mama MCF7.

**Tabla 7.1.** Actividad citotóxica a 72 h para los fármacos de referencia en ensayo de MTT<sup>91</sup>

Fármaco	CI <sub>50</sub> (µM)		
	A-549	SW480	HeLa
ABZ	-	0.45	-
FBZ	1.6	0.6	-
MBZ	0.42	-	-
NZ	0.087	0.12	0.71

Nota: El símbolo - indica que no existen reportes de actividad en las referencias consultadas

Tomando en consideración la suma de reportes disponibles para las referencias farmacológicas, fue posible apoyar el diseño de la evaluación de la actividad citotóxica en el caso de la serie LCG.

En esta sección se realizará el análisis de dicha actividad en las líneas celulares de cáncer de pulmón SK-LU-1, de colon SW620 y de mama MCF7; empezando por aquellos compuestos cuya sustitución aromática corresponde al naftilo, posteriormente se detallan los que presentan sustitución aromática de tipo quinolina y por último se revisará la inclusión del derivado PBS90. Adicionalmente se realizará una revisión de las predicciones derivadas del modelo *in silico* con el fin de reunir la información necesaria para comprobar si el diseño de la serie LCG resultó exitoso en el sentido de producir compuestos con actividad citotóxica apreciable.

**Tabla 7.2.** Actividad citotóxica de los CBZ a 72 h. Se señala la  $CI_{50}$  ( $\mu M$ )  $\pm$  D.E. con una  $n=3$  para cada compuesto evaluado

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )		
	SK-LU-1	SW620	MCF7
LCG1	0.076 $\pm$ 0.005	0.082 $\pm$ 0.006	>10
LCG2	1.47 $\pm$ 0.054	1.74 $\pm$ 0.109	>10
LCG3	1.46 $\pm$ 0.103	1.25 $\pm$ 0.059	>10
LCG4	2.09 $\pm$ 0.102	3.90 $\pm$ 0.097	>10
LCG5	0.63 $\pm$ 0.001	0.77 $\pm$ 0.015	>10
LCG6	7.93 $\pm$ 0.268	19.6 $\pm$ 0.870	>10
PBS90	1.28 $\pm$ 0.019	1.29 $\pm$ 0.070	>10
ABZ	0.49 $\pm$ 0.026	0.53 $\pm$ 0.027	>10
FBZ	0.46 $\pm$ 0.042	0.56 $\pm$ 0.022	>10
MBZ	0.53 $\pm$ 0.037	0.55 $\pm$ 0.049	>10

La selección de las líneas celulares usadas en este estudio se realizó considerando dos criterios. En primer lugar se contempló que las líneas seleccionadas podrían presentar a las isoformas  $\beta I$  y  $\beta III$ , porque su fenotipo

corresponde al tejido que comúnmente sobre expresa dichas isoformas; en un segundo término se estimó la incidencia epidemiológica de los principales tipos de cáncer a nivel nacional.

En la Tabla 7.2 se señalan los resultados de la actividad citotóxica de los carbamatos bencimidazólicos de la serie LCG y los compuestos de referencia; estas actividades fueron evaluadas con el ensayo de MTT a 72 h. A continuación se describen las observaciones más sobresalientes que se obtienen del análisis de la presente tabla.

Los fármacos de referencia fueron administrados en un esquema de concentración que va de un rango de 0.01-10  $\mu\text{M}$ . En las tres líneas celulares empleadas estos compuestos presentaron mayor actividad citotóxica que cinco de los seis derivados de la serie LCG. Por otro lado, la  $\text{CI}_{50}$  de los diez compuestos evaluados se mantuvo en el mismo rango de unidades en las líneas celulares SK-LU-1 y SW620, aunque cabe señalar, que en el caso de la línea celular MCF7 no fue posible asignar un valor de  $\text{CI}_{50}$  debido a que no es posible realizar la evaluación de la citotoxicidad por encima de la máxima concentración soluble para estos compuestos, misma que corresponde a un valor aproximado de 10  $\mu\text{M}$ .

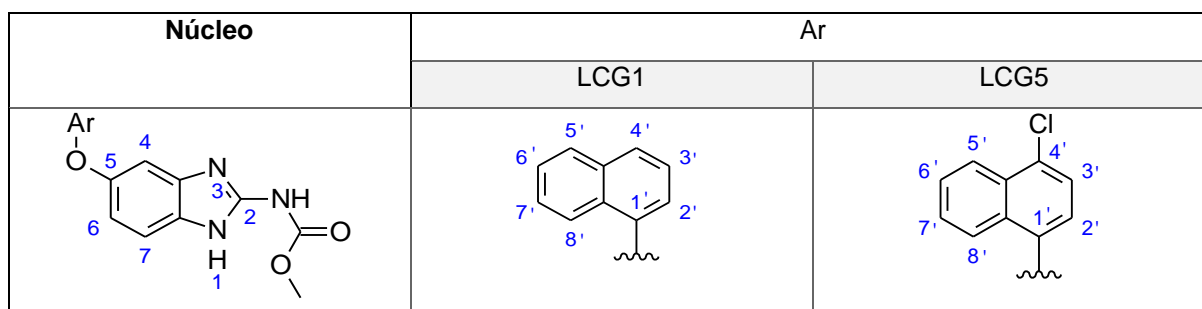
La serie LCG consta de seis compuestos sintetizados a partir de la ciclo condensación entre la *o*-fenilendiamina debidamente sustituida y *N,N*- dimetoxicarbonil-*S*-metilisotiourea, de modo tal que todos estos derivados comparten el núcleo del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo y el conector de oxígeno, distinguiéndose entre sí gracias a la sustitución aromática del tipo naftilo o quinolina (Figura 2.5). Los derivados LCG1 y LCG5 comparten al naftilo como sustituyente aromático; mientras que los derivados LCG2, LCG3, LCG4 y LCG6 están sustituidos por quinolina.<sup>51</sup> Por su parte, el derivado PBS90; cuya estructura puede ser consultada en la sección de anexos correspondiente, originalmente fue sintetizado como un análogo del triclabendazol y ha sido incluido en el presente reporte de actividad citotóxica debido a que se desea analizar si el grupo

2,3-diclorofenilo de éste compuesto podría comportarse como un bioisótero del naftilo del derivado LCG1.<sup>92,93</sup>

Los derivados LCG1 y LCG5 (Figura 7.1) resultaron ser los derivados bencimidazólicos más activos de la serie LCG tanto en la línea celular SK-LU-1 como en SW620.

El compuesto LCG1 es el derivado más interesante de la serie porque su actividad citotóxica sobre las líneas antes mencionadas resultó ser seis veces superior a la de las referencias farmacológicas empleadas. Debido a su notoria actividad citotóxica, el derivado LCG1 se seleccionó para analizar si realmente la serie de derivados LCG produce alguna alteración en la dinámica normal de los microtúbulos.

Por su parte el compuesto LCG5 es el segundo derivado más activo, éste presenta actividad citotóxica comparable a la de las referencias farmacológicas, con una  $CI_{50}$  de 0.63 en la línea celular SK-LU-1 y de 0.77 en SW620  $\mu$ M. A diferencia del derivado anterior, este compuesto presenta una sustitución halogenada en la posición 4' del sustituyente naftilo, misma que ejerce un efecto electroattractor sobre el anillo.



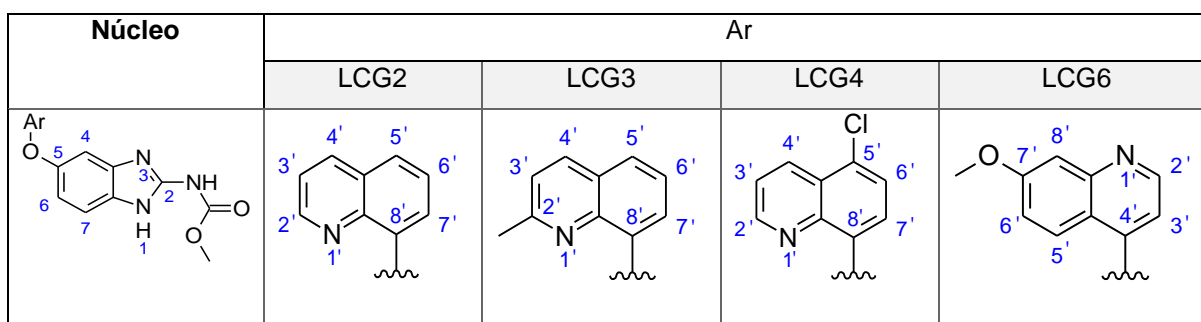
**Figura 7.1.** Detalles estructurales de los derivados LCG1 y LCG5.

En conjunto, las observaciones anteriores resultan relevantes debido a que resulta claro que la inclusión del naftilo favorece la actividad citotóxica de la serie LCG. Esta información concuerda con la que ya ha sido proporcionada por estudios previos, donde se ha demostrado que la adición de este sustituyente aromático en



la posición 5 del anillo bencimidazólico es un ejemplo de modificación exitosa que conduce a la actividad citotóxica.<sup>26</sup>

En cuanto a la sustitución de tipo quinolina se observa que la actividad citotóxica de los derivados LCG2, LCG3, LCG4 y LCG6 no fue superior a la de las referencias farmacológicas en las líneas celulares SK-LU-1 y SW620. En particular, el derivado LCG6 con metoxilo en la posición 7' del núcleo de quinolina, es el derivado con menor actividad citotóxica de la serie, dicha condición se cumple en las tres líneas celulares estudiadas siendo particularmente notoria en la línea celular SW620 con un valor de 19.6  $\mu\text{M}$  (Figura 7.2).



**Figura 7.2.** Detalles estructurales de los derivados LCG2, LCG3, LCG4 y LCG6.

La razón por la se incluyó el núcleo de quinolina como sustituyente aromático está fundamentada en reportes que han detallado que otro tipo de compuestos con buen potencial citotóxico y evaluados como inhibidores de la tubulina, contienen a este anillo heterocíclico en su estructura.<sup>94,95</sup> Sin embargo, en el caso de los derivados bencimidazólicos de la serie LCG, la actividad citotóxica de los compuestos con esta sustitución aromática no resultó tan llamativa en contraste con aquellos que están sustituidos con naftilo.

Los resultados de la actividad citotóxica de la serie LCG han permitido dejar en evidencia la necesidad de estudiar con mayor detalle el efecto que ejercen las sustituciones en la posición 5 del núcleo 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo. Dicho lo anterior, valdría la pena realizar la construcción de una biblioteca de datos de actividad con compuestos que exploren diversas modificaciones en la

posición antes referida, de modo tal que se permita dirigir el diseño de un análisis cuantitativo de la relación estructura actividad (QSAR) de los CBZ. Entre otras aportaciones, estos estudios permitirían apoyar la optimización de la actividad citotóxica en nuevos derivados bencimidazólicos así como dilucidar qué tipo de sustituciones heterocíclicas son determinantes para favorecerla, o bien, brindarían información precisa acerca de las propiedades fisicoquímicas que se requieren para potenciar la actividad de estos compuestos.

Por otro lado, aunque los derivados de la serie LCG fueron sintetizados considerando los resultados aportados por las predicciones del diseño *in silico*, este sistema predictivo presenta marcadas excepciones con relación a la actividad citotóxica observada, mismas que serán señaladas a continuación.

Los resultados del acoplamiento molecular entre la serie LCG y las isoformas  $\beta$ I y  $\beta$ III se presentaron con anterioridad en la Tabla 2.6. En dicha tabla se destacó que la afinidad de la serie de derivados bencimidazólicos LCG sería mayor a la de las referencias farmacológicas empleadas en las dianas referidas. Cabe destacar que el derivado LCG1 realmente es el único derivado de la serie LCG que podría cumplir tal predicción al presentar la mayor actividad citotóxica entre los CBZ analizados.

Es importante señalar que acoplamiento molecular de la serie LCG se realizó directamente sobre las isoformas de la  $\beta$  tubulina antes referidas en un modelo de predicción *in silico*. A diferencia de estos estudios, la actividad citotóxica de la serie LCG podría no depender exclusivamente de la afinidad de dichos compuestos sobre las dianas biológicas propuestas.

Considerando la  $CI_{50}$  del derivado LCG5 es posible afirmar que este compuesto no cumple con la predicción del acoplamiento molecular porque su actividad citotóxica fue semejante a la de las referencias ABZ, FBZ y MBZ. El criterio anterior además incluye a los derivados LCG2, LCG3 y LCG4, cuya actividad citotóxica es al menos dos veces menor a la de las referencias mencionadas.

El caso del compuesto LCG6 resulta interesante porque en el estudio computacional correspondiente se propuso que su particular sustitución de tipo metoxiquinolina favorecería la estabilización del complejo proteína-ligando a través de un puente de hidrógeno con los aminoácidos en el sitio de unión. Sin embargo, al ser precisamente el derivado con la mayor  $CI_{50}$  e inestabilidad en solución, se revela que la actividad citotóxica de la serie LCG depende no solo de las interacciones intermoleculares que pueden ser predichas a través de modelos *in silico*, sino también de factores asociados con su biodisponibilidad.

En cuanto al derivado PBS90 que tiene un valor de  $CI_{50}$  aproximado de 1.28  $\mu$ M, tanto en la línea celular SK-LU-1 como en la línea celular SW620, es posible apreciar que dicha actividad es 16 veces menor a la del derivado LCG1. Con lo anterior, se sugiere que las sustituciones 2,3-diclorofenilo del PBS90 no se comportan como bioisómeros de citotoxicidad en contraste con el naftilo del derivado LCG1, debido a que la actividad citotóxica entre estos compuestos no resultó ser equivalente.

Aun con las observaciones anteriores se desea destacar el éxito de la selección de los anillos heterocíclicos de naftilo y quinolina como sustituyentes aromáticos de la serie LCG porque el análisis de la actividad citotóxica de estos compuestos detalla que la serie presenta buena actividad frente a las líneas celulares de cáncer de pulmón y colon.

Finalmente es importante señalar que los resultados derivados del modelo *in silico* permitieron obtener una aceptable predicción de la actividad biológica *in vitro* de la serie LCG y acertó en la dirección de producir compuestos con actividad citotóxica, aunque es necesario tomar en cuenta que las observaciones derivadas a partir de estos estudios, necesariamente, deben ser confirmadas experimentalmente.<sup>96,97</sup>

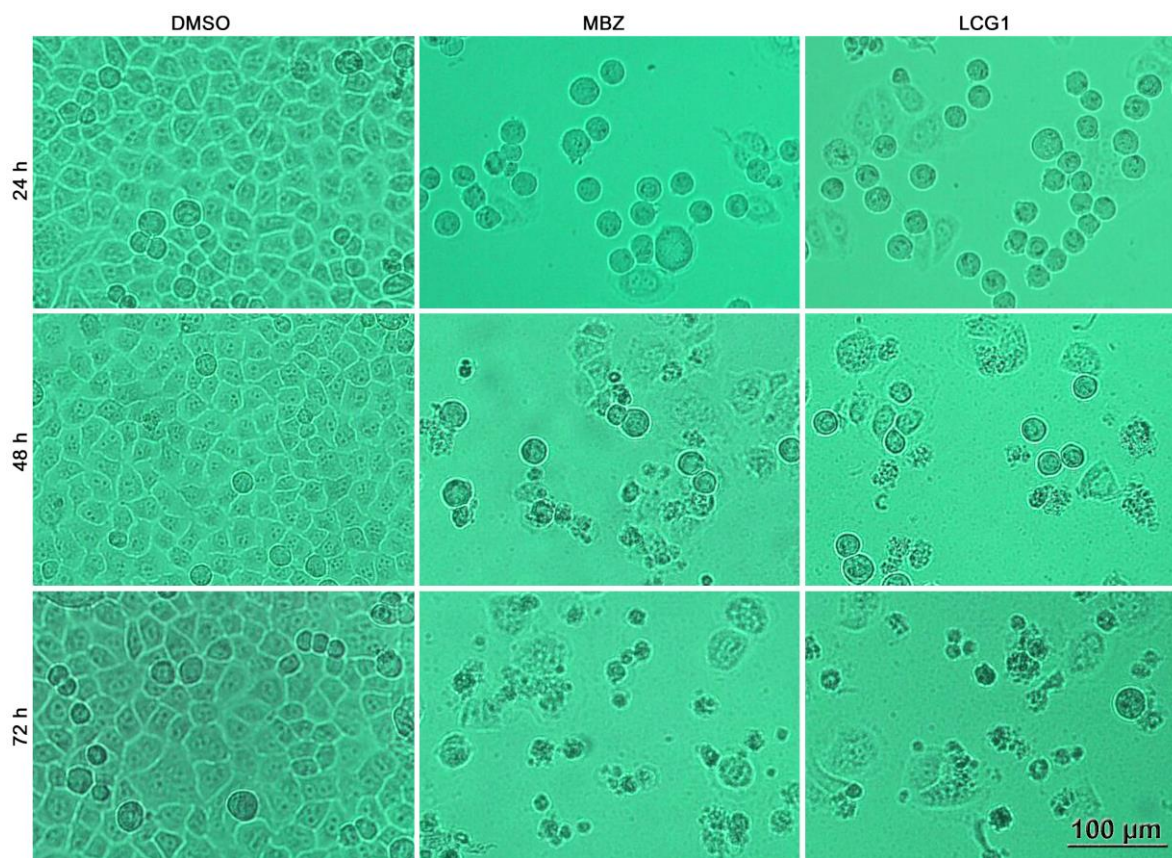
## 7.2 Cambios morfológicos de las líneas celulares SK-LU-1 y SW620

En los cultivos celulares los cambios en la forma o estructura de una célula pueden ser ocasionados por condiciones intra o extracelulares. Durante las condiciones normales de crecimiento celular se produce un cambio en la morfología debido a la motilidad de las células y a las variaciones del ciclo celular.<sup>98</sup>

Algunos de los cambios morfológicos más evidentes que atraviesa una célula, y en particular las células epiteliales, ocurren durante la mitosis. En este proceso, durante la interfase la morfología de las células es elongada, extendida y regular; mientras que en la fase M dicha morfología cambia hacia una forma circular y de menor área porque las células se redondean durante su división celular. Por lo tanto un cultivo celular normalmente expresa cantidades basales de estos cambios morfológicos, pero se ha observado que bajo la influencia de tratamientos farmacológicos que intervienen en la mitosis, la frecuencia con la que dichos cambios se producen se incrementa.<sup>98-100</sup>

Con la finalidad de determinar si la serie LCG afecta la morfología celular de las líneas celulares SK-LU-1 y SW620, en este apartado se describirán las observaciones de microscopía óptica que se obtuvieron durante la evaluación de actividad citotóxica de esta serie de compuestos. En las imágenes correspondientes se realizará la descripción del efecto observado considerando al DMSO como control experimental sin tratamiento y al mebendazol como control positivo del efecto.

La columna correspondiente al control del vehículo permite visualizar la morfología epitelial característica de la línea celular SK-LU-1 y cómo ésta se mantiene a lo largo del desarrollo experimental. (Figura 7.3)



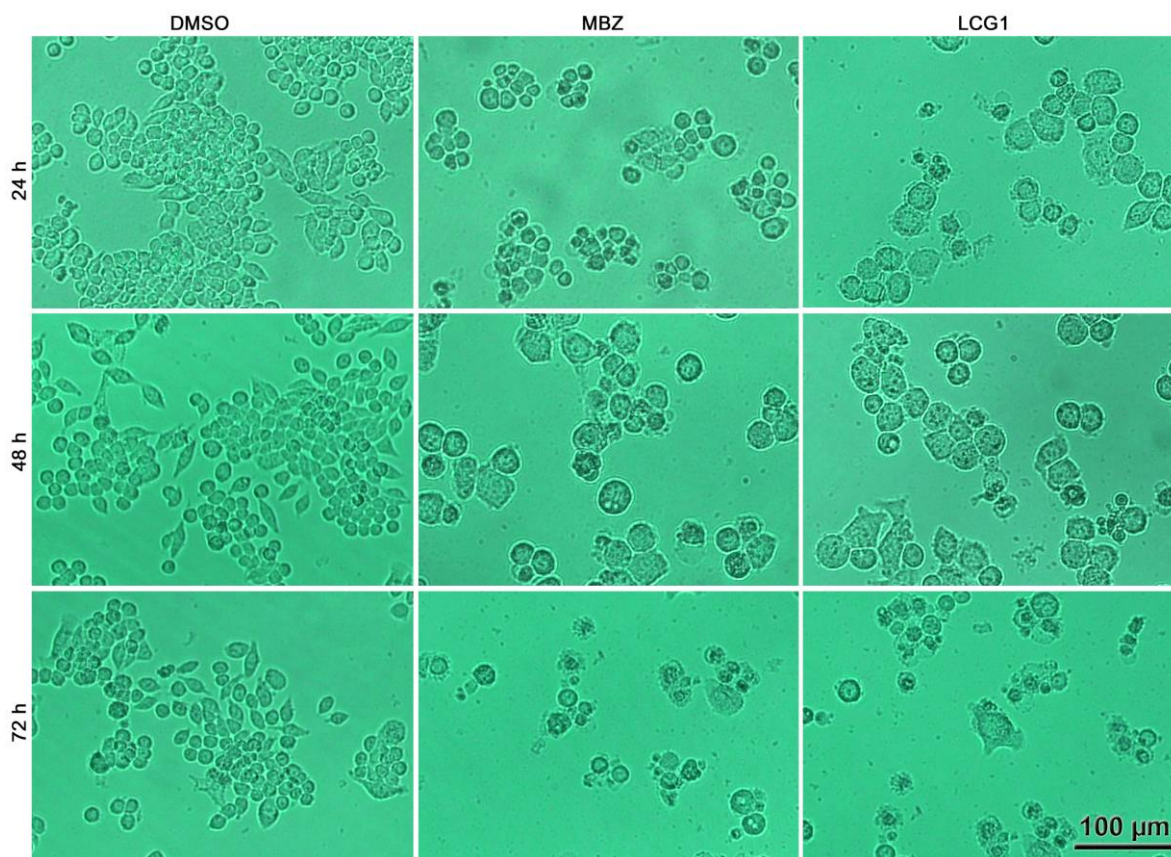
**Figura 7.3.** El derivado LCG1 administrado a su  $CI_{50}$  respectiva ( $0.08 \mu\text{M}$ ), al igual que el mebendazol ( $0.5 \mu\text{M}$ ), induce cambios morfológicos en la línea celular SK-LU-1 previos a la muerte celular. En orden descendente, los paneles corresponden a las células sin tratamiento; cultivo en presencia de los CBZ a las 24 h, 48 h y 72 h. Barra de escala:  $100 \mu\text{M}$

En la columna de fotografías que corresponden al tratamiento con el derivado LCG1 es posible observar que este compuesto, al igual que la referencia farmacológica, incrementa notoriamente la frecuencia con la que las células SK-LU-1 sufren una alteración en su morfología epitelial característica y cambian hacia una morfología esférica de menor tamaño a partir de las 24 h de exposición. Además, las imágenes obtenidas, permiten observar la pérdida de la viabilidad celular desde las 48 h de tratamiento misma que resulta particularmente evidente a 72 h.

En el caso de la línea celular SW620, las observaciones que resultaron del seguimiento de la actividad citotóxica del derivado LCG1 se señalan en la



Figura 7.4. En este panel de resultados se aprecian efectos muy similares a lo observado en la línea celular SK-LU-1 donde el mebendazol y el derivado LCG1, al administrarse en su  $CI_{50}$  respectiva, inducen cambios morfológicos que ocurren de manera previa a la muerte celular del cultivo.



**Figura 7.4.** El derivado LCG1 administrado a su  $CI_{50}$  respectiva ( $0.08 \mu\text{M}$ ), al igual que el mebendazol ( $0.5 \mu\text{M}$ ), induce cambios morfológicos en la línea celular SW620 previos a la muerte celular. En orden descendente, los paneles corresponden a las células sin tratamiento; cultivo en presencia de los CBZ a las 24 h, 48 h y 72 h. Barra de escala:  $100 \mu\text{M}$

A partir de las 24 h de tratamiento con el derivado LCG1 se observa el notorio incremento de la frecuencia con la que las células SW620 sufren una alteración en su morfología epitelial y cambian hacia una morfología esférica de menor tamaño. A las 48 h es posible apreciar que las células esféricas sufren un aumento de tamaño y posteriormente, a las 72 h, es posible apreciar que las células no fueron capaces de recuperar su morfología típica y su viabilidad está notoriamente reducida.

Es importante señalar que las observaciones realizadas en este apartado son congruentes con reportes previos de actividad que detallan la alteración en la dinámica de los microtúbulos mediada por los agentes de unión de la tubulina. En dichos reportes se destaca que las alteraciones a la dinámica de los microtubulos desencadenan irreversiblemente la muerte celular del cultivo.<sup>99,100</sup>

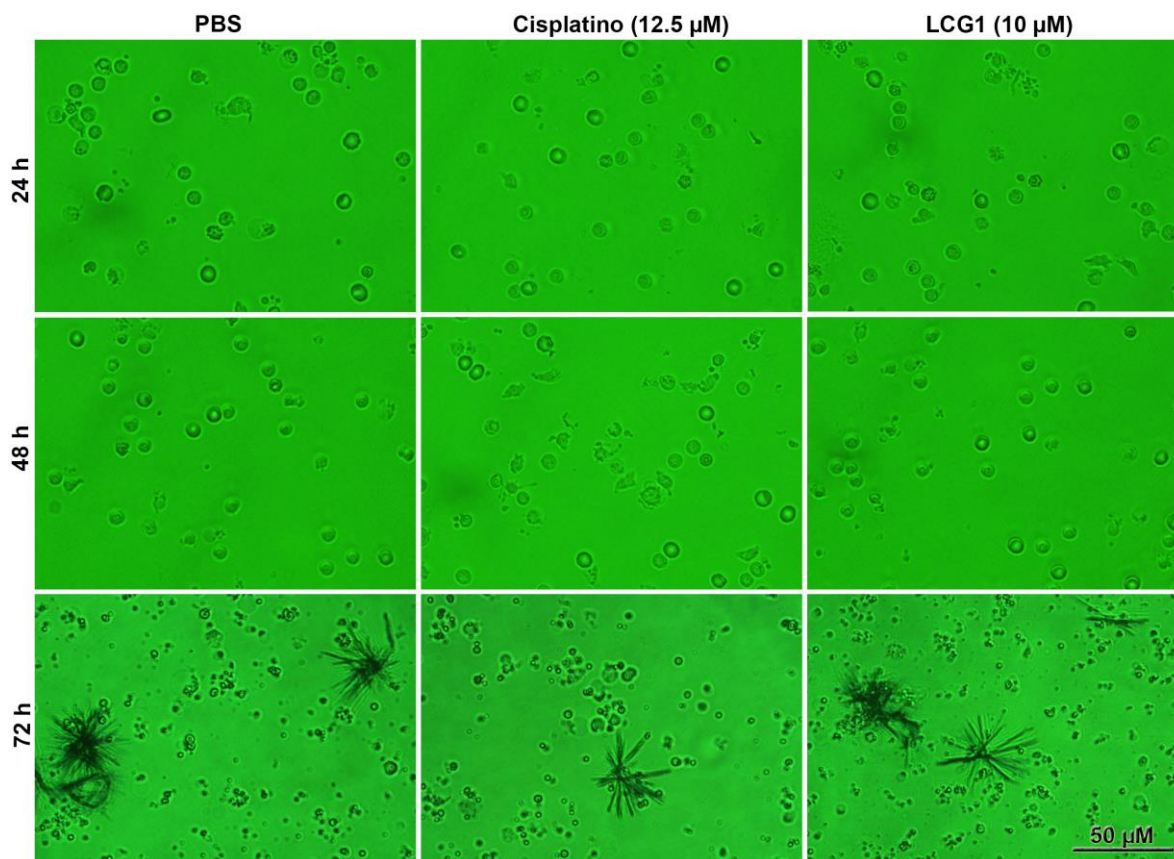
Con lo anterior se sugiere que los cambios morfológicos inducidos por el derivado LCG1 son resultado de la capacidad de este compuesto de interferir con la dinámica de los microtúbulos, sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales con el fin de determinar cuál es el mecanismo molecular por el que este compuesto produce la muerte celular en las líneas tumorales analizadas.

### **7.3 Actividad citotóxica de la serie LCG en células mononucleares de sangre periférica**

De acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios computacionales, los derivados de la serie LCG destacan entre otros compuestos reportados con afinidad a la  $\beta$ -tubulina debido a que presentan una gran afinidad hacia las isoformas  $\beta I$  y  $\beta III$ , pero no por la isoforma  $\beta VI$ .<sup>51</sup> Concretamente se ha observado que la isoforma  $\beta VI$  normalmente se expresa en médula ósea y células sanguíneas, y además, no existen reportes de tejidos afectados con cáncer que la sobreexpresen.<sup>43</sup> Lo anterior posiciona a estos compuestos como objeto de estudio interesante porque dichas características de afinidad pueden brindarles la capacidad de reducir los riesgos de toxicidad hematológica.<sup>78,79</sup>

Para confirmar si la serie de derivados LCG realmente presenta baja afinidad por la isoforma  $\beta VI$ , se realizó la evaluación de la toxicidad en células mononucleares de sangre periférica en cultivos primarios, empleando como control de toxicidad positivo al cisplatino. La determinación de la viabilidad celular se realizó con el método de MTT durante periodos de evaluación de 72 h, y al igual que en los cultivos celulares de cáncer, durante la realización de este ensayo se realizó la observación microscópica de la morfología del cultivo primario (Figura 7.5).

En la metodología antes referida, la reducción del MTT es un evento que ocurre exclusivamente en células metabólicamente activas y viables. Este criterio se empleó como una evaluación indirecta de la toxicidad del derivado LCG1 en el cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica.



**Figura 7.5.** Actividad metabólica del cultivo primario de leucocitos. El derivado LCG1 no reduce apreciablemente la actividad metabólica de células mononucleares de sangre periférica a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 72 h. Barra de escala: 50  $\mu\text{M}$

Las observaciones anteriores corresponden al seguimiento de la toxicidad del derivado LCG1 y el cisplatino durante las 72 h de tratamiento.

En la columna correspondiente al control de vehículo es posible observar la morfología típica las células mononucleares viables así como una actividad metabólica apreciable. Por su parte, en la columna de fotografías que corresponden al tratamiento con el derivado LCG1 a 10  $\mu\text{M}$ , es posible apreciar que dicho compuesto aparentemente no afecta la actividad metabólica de las



células; mientras que, en presencia de cisplatino a una concentración de 12.5  $\mu\text{M}$  la producción de cristales de formazán se reduce considerablemente.

Los resultados obtenidos, sugieren que el derivado LCG1 no presenta actividad citotóxica apreciable en contra las células mononucleares de sangre periférica, puesto que su administración parece no interferir la actividad metabólica de dicho cultivo. Estos resultados podrían sustentar la idea de que el derivado LCG1 no afecta significativamente la viabilidad de células sanas.

En la Tabla 7.3 se reportan los resultados preliminares obtenidos en la determinación de la densidad óptica del formazán a las 72 h de tratamiento.

**Tabla 7.3.** Resultados preliminares de la toxicidad en células mononucleares de sangre periférica del derivado LCG1 a 72 h. Se señala el porcentaje de viabilidad celular con una n=2 para cada tratamiento.

<b>LCG1 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Viabilidad celular (%)</b>	<b>Cisplatino (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Viabilidad celular (%)</b>
<b>10</b>	91 $\pm$ 2.9	<b>100</b>	9 $\pm$ 6.1
<b>7.5</b>	97 $\pm$ 7.9	<b>50</b>	6 $\pm$ 9.3
<b>5</b>	107 $\pm$ 28.9	<b>25</b>	18 $\pm$ 9.1
<b>2.5</b>	93 $\pm$ 7.2	<b>12.5</b>	73 $\pm$ 27.1
<b>1.25</b>	103 $\pm$ 27.1	<b>6.25</b>	79 $\pm$ 32.4
<b>0.625</b>	92 $\pm$ 9.9	<b>3.125</b>	77 $\pm$ 25.2
<b>0</b>	100	<b>0</b>	100

Aunque los resultados presentados en la tabla anterior son preliminares, su importancia radica en el hecho de que apoyan las observaciones microscópicas que sugieren que el derivado LCG1 no produce disminución significativa de la actividad metabólica de las células mononucleares.

Con los resultados obtenidos hasta el momento se sugiere que el derivado LCG1 no afecta significativamente la viabilidad de células sanas, en contraste con su

actividad frente a líneas celulares de cáncer, lo cual es un indicio preliminar de su selectividad.

Dicho lo anterior, se desea enfatizar que es necesario confirmar definitivamente la ausencia de citotoxicidad del derivado LCG1 en células mononucleares sanas.

Es importante destacar que los resultados de la tabla 7.3 son de carácter estrictamente preliminar y presentan problemas de reproducibilidad debido al método seleccionado para cuantificar la densidad óptica del producto de reducción del MTT, principalmente por las dificultades que a continuación se describen.

Las células mononucleares corresponden a un cultivo primario de células no adherentes, a diferencia de las líneas celulares derivadas de tumores, esto conduce a que los cristales de formazán producidos en el interior de las células mononucleares permanezcan suspendidos y se pierdan al momento de descartar el medio de cultivo sobrenadante para realizar la lectura espectrofotométrica.

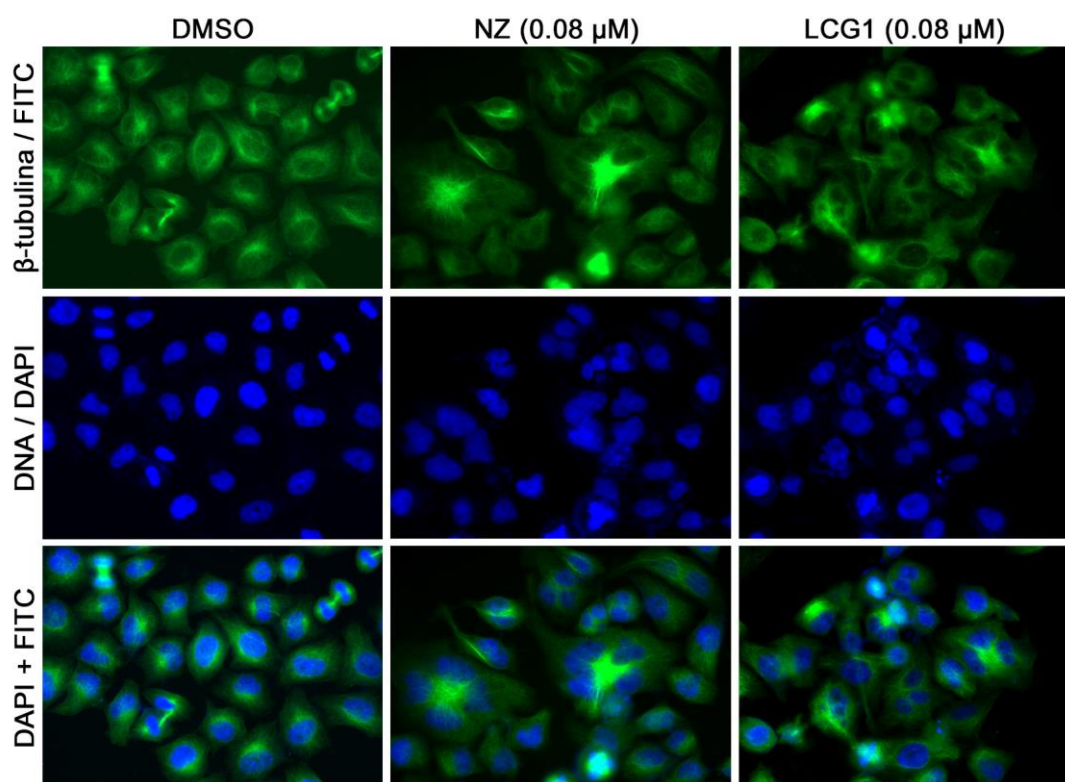
Estos problemas asociados con el método deben ser tomados en cuenta para el diseño y realización de futuras evaluaciones, debido a esto que se considera que una alternativa válida para evitar tales dificultades sería el uso de la sal de XTT. Éste compuesto comparte el fundamento metodológico de reducción metabólica con el MTT, pero la sal de XTT cuenta con la propiedad de que su producto de reducción es soluble en el medio de cultivo empleado, a diferencia del formazán. La solubilidad de dicho producto permitiría realizar la determinación de la densidad óptica de manera directa sin la necesidad de hacer una manipulación adicional al cultivo celular empleado.

Finalmente el uso de la sal de XTT permitiría confirmar la ausencia de citotoxicidad del derivado LCG1 sobre las células mononucleares sanas en futuras evaluaciones.

#### 7.4 Ensayo de inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia es una técnica que utiliza anticuerpos que contienen un marcador fluorescente para realizar la detección de un blanco específico.<sup>101</sup>

En el presente proyecto de tesis se realizó un ensayo de inmunofluorescencia directa dirigido contra la  $\beta$ -tubulina de la línea celular SK-LU-1 con el propósito de analizar si el derivado LCG1 es capaz de alterar la organización normal de dicha proteína. Los resultados obtenidos haciendo uso de esta técnica se resumen en el panel de la Figura 7.6 y su análisis está descrito a continuación.



**Figura 7.6.** Al igual que la referencia farmacológica, el derivado LCG1 induce cambios en la distribución celular de la  $\beta$ -tubulina de las células SK-LU-1 y lidera la formación de células multinucleadas a las 48 h de ser evaluado en su  $CI_{50}$  correspondiente.

Los compuestos que son capaces de interferir con la dinámica del huso mitótico son capaces de ocasionar el arresto crónico de la mitosis, el cual puede culminar en la muerte celular.<sup>99</sup>

Sin embargo, las células detenidas pueden tomar una ruta alternativa conocida como escape mitótico o *mitotic slippage* y evitar así la muerte celular mitótica. En este mecanismo de escape las células salen prematuramente de la mitosis sin llevar a cabo una adecuada segregación cromosómica, de modo tal que llevan a cabo nuevos ciclos de replicación de ADN sin citocinesis, lo que conduce a tetraploidía y células multinucleadas.<sup>99,100,102</sup>

En la Figura 7.6, las celdas que conforman la columna correspondiente al control del vehículo (DMSO) muestran la morfología epitelial típica de la línea celular SK-LU-1 así como la distribución normal de su contenido de ADN y  $\beta$ -tubulina. En esta columna, la fotografía que captura la señal correspondiente a FITC muestra que la tubulina de las células no tratadas se encuentra homogéneamente localizada en el citoplasma o en polos opuestos durante las fases finales de la mitosis; por otro lado, con la fotografía de la señal correspondiente a DAPI se aprecia que los cromosomas se distribuyen con normalidad hacia polos celulares opuestos en la telofase.

Las observaciones más sobresalientes de este ensayo resultan de las fotografías correspondientes a la exposición de las células con los carbamatos bencimidazólicos.

En la columna correspondiente al tratamiento con el derivado LCG1 se observa que este compuesto es capaz de liderar la formación de células multinucleadas, las cuales presentan irregularidades en la distribución del huso cromático y son tetraploides. En esta columna de tratamiento, es posible observar que las células presentan acumulación inusual del huso mitótico en su interior y son de gran tamaño; por otra parte, gracias a la señal de DAPI es posible observar que además estas células contienen varios núcleos de ADN que no fueron segregados uniformemente en células individuales. Finalmente, en la última fotografía de la columna correspondiente al tratamiento con el derivado LCG1, se observa la aparición de micronúcleos de ADN.

En la columna correspondiente al tratamiento con nocodazol también se observan irregularidades en cuanto a la distribución de la  $\beta$ -tubulina y el ADN de las células SK-LU-1.

Es importante enfatizar que los resultados obtenidos en esta sección son congruentes con las observaciones de reportes previos donde se señala que, tanto los agentes de unión a la tubulina como el nocodazol, son capaces de inducir el escape mitótico en algunas líneas celulares. En este mecanismo de escape las células tratadas con dichos compuestos salen prematuramente de la mitosis, sin llevar a cabo una adecuada segregación cromosómica, lo que conduce a tetraploidía y formación de multinúcleos.<sup>103,104</sup>

Con base en lo anterior se sugiere que las células tratadas con los derivados bencimidazólicos sufren alteraciones morfológicas debido a que estos compuestos podrían estar liderando la formación de células multinucleadas tetraploides a través del escape mitótico de las células SK-LU-1. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, no es posible distinguir si los derivados bencimidazólicos ocasionan un mecanismo de muerte celular en particular.

Por otro lado, en el caso particular del tratamiento con el derivado LCG1; se propone que los micronúcleos de ADN que se observaron en la fotografía que contiene la señal combinada de FITC y DAPI, se producen gracias a que las células que se someten al deslizamiento mitótico contienen cromosomas retardados que generan pequeños fragmentos de ADN debido al impedimento de la segregación cromosómica normal.<sup>105</sup>

Finalmente, con los resultados de esta sección, es posible afirmar que el derivado LCG1 produce alteraciones en la distribución normal del ADN y la  $\beta$ -tubulina que lideran la formación de células multinucleadas en las células SK-LU-1.

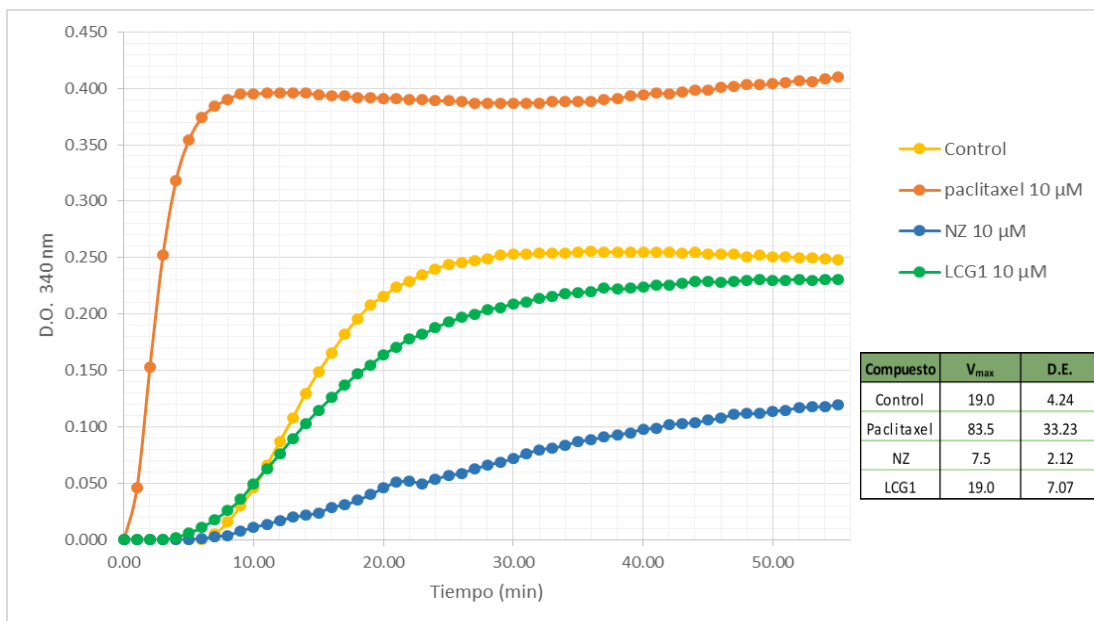
## 7.5 Polimerización *in vitro* de la tubulina

Los fármacos que actúan sobre los microtúbulos se pueden dividir en dos grupos según su mecanismo de acción, ya sea como agentes desestabilizadores o como agentes estabilizadores de los microtúbulos.<sup>27,32</sup>

Para realizar la identificación del efecto de los fármacos que tienen como diana celular a la tubulina es posible valerse de procedimientos espectrofotométricos.<sup>38</sup> El ensayo de polimerización de tubulina (Cytoskeleton®, #BK006P) se basa en una adaptación del método original de Shelanski et al. y Lee et al. quienes demostraron que la densidad óptica producida por la polimerización de los microtúbulos es directamente proporcional a su concentración.<sup>106</sup> En condiciones normales, la estabilidad del equilibrio de polimerización de los microtúbulos es dependiente de la temperatura, es decir, si los microtúbulos se mantienen a 4 °C se despolimerizan produciendo la exclusión de dímeros estables de  $\alpha/\beta$ -tubulina, quienes pueden repolimerizarse a 37 °C en presencia de GTP. A 37 °C se obtiene una curva que representa las tres fases de polimerización de los microtúbulos: nucleación, crecimiento y equilibrio en estado estacionario.<sup>107</sup>

A continuación, se señalan los parámetros que describen las curvas cinéticas de polimerización que fueron obtenidas con ayuda del ensayo (Cytoskeleton®, #BK006P) así como su análisis correspondiente.

En este ensayo es posible describir el efecto de los agentes que interfieren la dinámica de polimerización a través de la observación de anomalías en alguna de las fases, o bien, mediante la evaluación de la cantidad de la estructura polimerizada, misma que se determina a través de la  $V_{max}$  resultante en la fase de equilibrio. De este modo, este ensayo permite la identificación de nuevos compuestos que son potencialmente útiles contra el cáncer.<sup>33,108</sup>



**Figura 7.7.** Efectos en la cinética de polimerización de la tubulina. El derivado LCG1 a 10  $\mu\text{M}$  produce un discreto retardo de la fase de crecimiento en la cinética de polimerización de la tubulina (3 mg/mL) a 340 nm y 37  $^{\circ}\text{C}$ .

En la curva cinética correspondiente al control normal de polimerización, la fase de nucleación puede observarse en los primeros 5 min del ensayo, a partir de este tiempo y hasta los 20 min de ensayo se lleva a cabo la fase de crecimiento; finalmente, la fase del equilibrio estacionario se observa a partir de los 25 min. (Figura 7.7).

A la concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , el paclitaxel; que se incluyó en estos ensayos como un control positivo del efecto, inhibe la dinámica de polimerización de los microtúbulos porque estabiliza la fase de crecimiento de la estructura polimerizada. En la Figura 7.7 este efecto se manifiesta con la eliminación de la fase de nucleación y el mejoramiento de la  $V_{\text{max}}$  en la fase de crecimiento. Lo anterior concuerda con los reportes de actividad disponibles para este compuesto.<sup>54,108</sup>

El nocodazol, que se incluyó como control negativo del efecto, inhibe la polimerización de los microtúbulos a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  porque interfiere en su fase de crecimiento. En la figura 7.7 se observa que la  $V_{\text{max}}$  de este fármaco

es al menos 1.8 veces menor a la del control, confirmando así su actividad inhibidora.<sup>25,108,109</sup>

En el caso del derivado LCG1 es posible observar un retardo discreto en la fase de crecimiento, lo que sugiere que este derivado podría interferir en los procesos asociados al ensamblaje de los microtúbulos.

Es importante señalar que se requiere realizar más determinaciones para confirmar definitivamente si el derivado LCG1 inhibe la polimerización de los microtúbulos. En este ensayo, la pobre solubilidad acuosa de los derivados bencimidazólicos podría impactar considerablemente su actividad debido a las condiciones en las que se realiza, porque se requiere que los compuestos de interés se disuelvan a una concentración 10 veces superior a la requerida en la lectura espectrofotométrica.

Debido a las condiciones anteriormente descritas, la actividad del derivado LCG1 podría no haberse puesto en evidencia dada su pobre solubilidad, en contraste con este compuesto, la actividad de los controles implementados resultó congruente con lo reportado en la literatura.<sup>108</sup>

Los resultados obtenidos plantean la necesidad de realizar nuevas determinaciones que permitan confirmar definitivamente la capacidad del derivado LCG1 de inhibir a los microtúbulos, de modo tal que dichos ensayos deberán considerar la escasa solubilidad de los derivados bencimidazólicos en sistemas acuosos.



## 8. CONCLUSIONES

Respecto a la actividad citotóxica de los CBZ:

Los derivados de la serie LCG presentaron actividad citotóxica contra las líneas celulares SK-LU-1 y SW620.

El derivado LCG1 resultó ser el compuesto más citotóxico de la serie y su actividad resultó ser mayor a la de los fármacos de referencia.

De manera preliminar, el compuesto LCG1 no presentó toxicidad apreciable en contra de células mononucleares sanas, lo cual sugiere que este derivado podría presentar selectividad por células cancerígenas.

En cuanto a los cambios de morfología inducidos por los CBZ:

El derivado LCG1 produjo cambios en la morfología de las células SK-LU-1 y SW620 previos a la muerte celular del cultivo.

A su vez, el derivado LCG1, indujo alteraciones en la distribución normal del ADN y la  $\beta$ -tubulina que lideran la formación de células multinucleadas en las células SK-LU-1.

Respecto al efecto sobre la polimerización *in vitro* de la tubulina:

El derivado LCG1 a 10  $\mu$ M produjo un discreto retardo la fase de crecimiento en la cinética de polimerización de la tubulina, con lo anterior se sugiere que dicho derivado podría interferir los procesos asociados al ensamblaje de los microtúbulos, no obstante, cabe señalar que se requiere realizar nuevas determinaciones para confirmar definitivamente esta propiedad.

## 9. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados hasta el momento permiten confirmar la capacidad citotóxica de los derivados bencimidazólicos de la serie LCG frente algunas líneas celulares de cáncer así como las alteraciones que desencadenan en la distribución del ADN y la  $\beta$ -tubulina en la línea celular SK-LU-1; no obstante, hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular de muerte celular que estos compuestos ocasionan. Por tales motivos, se plantean las siguientes perspectivas que pueden apoyar el diseño y realización de futuras evaluaciones:

- Estudiar con mayor detalle el efecto que ejercen las sustituciones en la posición 5 del núcleo 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo con el fin de apoyar la optimización de la actividad citotóxica en nuevos derivados bencimidazólicos.
- Caracterizar la  $CI_{50}$  de los derivados bencimidazólicos de la serie LCG en ensayos de citotoxicidad sobre células mononucleares de sangre periférica con la técnica de XTT.
- Determinar el mecanismo molecular de muerte celular que desencadena la serie de derivados bencimidazólicos LCG. Se propone estudiar el mecanismo mediante ensayos que permitan estudiar vías de activación de caspasas, o bien, mediante ensayo de TUNEL.
- Comprobar si los derivados bencimidazólicos de la serie LCG producen arresto del ciclo celular en ensayos de citometría de flujo con células teñidas con yoduro de propidio.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
2. National Cancer Institute (NCI). Disponible en: <https://www.cancer.gov>. Consultado el 1° de Julio, 2017.
3. Instituto nacional de estadística y geografía (INEGI). Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
4. Hanahan, D. y Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Instituto Nacional de Cáncer (INCan). Disponible en: <http://www.cancer.gov> Consultado el 1° de julio, 2017.
6. OMS, estudio estratificado en México (Cáncer). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
7. Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. y Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature Reviews Cancer* **6**, 924–935 (2006).
8. Organización Mundial de la Salud (Cancer mortality trends). Age-standardized cancer mortality incidence (2014). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
9. A. Cairns, R., S. Harris, I. y W. Mak, T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* **11**, 85–95 (2011).
10. Devita, Vincent T., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg. Cancer principles and practice of oncology by Lippincott Williams and Wilkins. E.E.U.U. 6th Edition. (2001). ISBN: 9781451192940. pp. 2374.
11. Valdespino Gómez, V. Cancer initiation and progression: A biological system. *Gaceta Mexicana de Oncología* **10**, 358–365 (2011).
12. Ridge, S. M., Sullivan, F. J. y Glynn, S. A. Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular Cancer* **16**, 31 (2017).

13. American Cancer Society (ACS). Disponible en: [www.cancer.org/acs/](http://www.cancer.org/acs/). Consultado el 1° de julio, 2017.
14. DeVita, V. T. y Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research* **68**, 8643–8653 (2008).
15. Lopes, J. M., Gonçalves, F. R., Borges, M., Redondo, P. y Laranja-pontes, J. The cost of cancer treatment in Portugal. *Medical Science* **11:765**, 1–10 (2017).
16. Li, D. Consolidation chemotherapy improves progression-free survival in stage III small-cell lung cancer following concurrent chemoradiotherapy: A retrospective study. *Onco-Targets and Therapy* 5729–5736 (2016).
17. Allan, J. M. y Travis, L. B. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* **5**, 943–55 (2005).
18. Vanneman, M. y Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer* **12**, 237–251 (2012).
19. Loong, H. H. y Yeo, W. Microtubule-targeting agents in oncology and therapeutic potential in hepatocellular carcinoma. *OncoTargets and Therapy* **7**, 575–585 (2014).
20. FDA Approved Drugs. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
21. Drugbank. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/>. Consultado el 1° de julio, 2017.
22. Downing, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Cell and Developmental Biology Journal* **16**, 89–111 (2000).
23. Andreopoulou, E. y Muggia, F. Pharmacodynamics of tubulin and tubulin-binding agents: Extending their potential beyond taxanes. *Clinical Breast Cancer* **8**, 54–60 (2008).
24. Dumontet, C. y Jordan, M. A. Microtubule-binding agents: A dynamic field of

- cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 790–803 (2010).
25. Guan, Q., Han, C., Zuo, D., Zhai, M., et al. Synthesis and evaluation of benzimidazole carbamates bearing indole moieties for antiproliferative and antitubulin activities. *European Journal of Medicinal Chemistry* **87**, 306–315 (2014).
  26. Wang, W., Cai, X., Shi, T., Zhang, Y., Wang, Z., Liu, C., Zhu, H. New benzimidazole-2-urea derivatives as tubulin inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **24**, 4250–4253 (2014).
  27. Jordan, M. A. y Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer* **4**, 253–265 (2004).
  28. Risinger, A. L., Giles, F. J. y Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treatment Reviews* **35**, 255–261 (2009).
  29. Akhmanova, A. y Steinmetz, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: Two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **16**, 711–726 (2015).
  30. Akhmanova, A. y Steinmetz, M. O. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 309–322 (2008).
  31. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K., Soni, R. y Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry* **87**, 89–124 (2014).
  32. Hawkins, T., Mirigian, M., Selcuk Yasar, M. y Ross, J. L. Mechanics of microtubules. *Journal of Biomechanics* **43**, 23–30 (2010).
  33. Lüders, J. The microtubule cytoskeleton: Organisation, function and role in disease. *Springer. Methods in Molecular Biology* **1**, 1-189 (2016)
  34. Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.E., et al. Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: Rate constants and transition frequencies. *Journal of Cell Biology* **107**, 1437–1448 (1988).

35. Tetsuya Horio, H. H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**, 605–607 (1986).
36. Kirschner, M. W. Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers. *Journal of Cell Biology* **86**, 330–334 (1980).
37. Cassimeris, L., Pryer, N. K. y Salmon, E. D. Real time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *Journal of Cell Biology* **107**, 2223–2231 (1988).
38. Straube, A. Microtubule Dynamics. *Springer. Methods in Molecular Biology* **777**, 127–145 (2011).
39. Brouhard, G. J. y Rice, L. M. The contribution of  $\alpha/\beta$  tubulin curvature to microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology* **207**, 323–334 (2014).
40. Gardner, M. K., Zanic, M., y Howard, J. Microtubule catastrophe and rescue. *Current Opinion in Cell Biology* **25**, 14–22 (2014).
41. Mitchison, T. y Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).
42. Howard, J. y Hyman, A. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 569–574 (2009).
43. 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* **67**, 214–223 (2010).
44. Kavallaris, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer* **10**, 194–204 (2010).
45. Gajewski, M. M., Tuszynski, J. A., Barakat, K., Huzil, J. T. y Klobukowski, M. Interactions of laulimalide, peloruside, and their derivatives with the isoforms of  $\beta$ -tubulin. *Canadian Journal of Chemistry* **91**, 511–517 (2013).
46. Torin Huzil, J., Ludueña, R. F. y Tuszynski, J. Comparative modelling of human  $\beta$ -tubulin isotypes and implications for drug binding. *Nanotechnology* **17**, 590–5100 (2006).

47. Ravanbakhsh, S., Gajewski, M., Greiner, R. y Tuszynski, J. A. Determination of the optimal tubulin isotype target as a method for the development of individualized cancer chemotherapy. *Theoretical Biology and Medical Modelling* **10**, 29 (2013).
48. Wehbe, H., Kearney, C. M. y Pinney, K. G. Combretastatin A-4 resistance in H460 human lung carcinoma demonstrates distinctive alterations in  $\beta$ -tubulin isotype expression. *Anticancer Research* **25**, 3865–3870 (2005).
49. Gonçalves, A., Braguer, D., Kamath, K., Martello, L., Briand, C., Horwitz, S., Jordan, M. A. Resistance to Taxol® in lung cancer cells associated with increased microtubule dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11737–11742 (2001).
50. Murray, S., Briasoulis, E., Linardou, H., Bafaloukos, D. y Papadimitriou, C. Taxane resistance in breast cancer: Mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treatment Reviews* **38**, 890–903 (2012).
51. Cano González, L. Síntesis y evaluación *in silico* de nuevos carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina. *Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.* (2015).
52. Van Vuuren, R. J., Visagie, M. H., Theron, A. E. y Joubert, A. M. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **76**, 1101–1112 (2015).
53. Prota, A. E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J. J., Díaz, J. F., Altmann, K. H., Steinmetz, M.O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* **339**, 587–590 (2013).
54. Yang, C. P. H. y Horwitz, S. B. Taxol®: The first microtubule stabilizing agent. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 12 (2017).
55. McGrogan, B. T., Gilmartin, B., Carney, D. N. y McCann, A. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. *Reviews on Cancer* **1785**, 96–132 (2008).
56. Mooberry, S. L., Randall-Hlubek, D. A., Leal, R. M., Hegde, S. G., Hubbard,

- R. D., Zhang, L., Wender, P. A. Microtubule-stabilizing agents based on designed laulimalide analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 8803–8 (2004).
57. Prota, A. E., Bargsten, K., Northcote, P. T., Marsh, M., Altmann, K. H., Miller, J. H., Díaz, J. F., Steinmetz, M. O. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside-A. *Drug Discovery* **53**, 1621–1625 (2014).
58. Amos, L. A. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **22**, 916–926 (2011).
59. Lu, H., Murtagh, J. y Schwartz, E. L. The microtubule binding drug laulimalide inhibits vascular endothelial growth factor induced human endothelial cell migration and is synergistic when combined with docetaxel (taxotere). *Molecular Pharmacology* **69**, 1207–15 (2006).
60. 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. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **283**, 102–111 (2016).
61. Prota, A. E., Bargsten, K., Diaz, J. F., Marsh, M., Cuevas, C., Liniger, M., Neuhaus, C., Andreu, J. M., Altmann, K. H., Steinmetz, M. O. A new tubulin binding site and pharmacophore for microtubule destabilizing anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 13817–13821 (2014).
62. Lacey, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology* **18**, 885–936 (1988).
63. Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y. y Morris, D. L. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: A xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **55**, 425–432 (2005).



64. Dogra, N. y Mukhopadhyay, T. Impairment of the ubiquitin-proteasome pathway by methyl N-(6-phenylsulfanyl-1*H*-benzimidazol-2-yl)carbamate leads to a potent cytotoxic effect in tumor cells: A novel antiproliferative agent with a potential therapeutic implication. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30625–30640 (2012).
65. 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. *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 1201–1209 (2002).
66. 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. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **25**, 1982–1985 (2015).
67. 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 Letters* **165**, 43–49 (2001).
68. Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R. y Roth, J. A. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* **8**, 2963–9 (2002).
69. Bansal, Y. y Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **20**, 6208–6236 (2012).
70. Shah, K., Chhabra, S., Shrivastava, S. K. y Mishra, P. Benzimidazole: A promising pharmacophore. *Medicinal Chemistry Research* **22**, 5077–5104 (2013).
71. Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B. y Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology* **162**, 1239–1249 (2011).
72. Aguayo Ortiz, R., Cano González, L., Castillo, R., Hernández Campos, A. y Dominguez, L. Structure-based approaches for the design of benzimidazole-

- 2-carbamate derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design* **90**, 40–51 (2017).
73. Afzal, O., Kumar, S., Haider, M. R., Ali, M. R., Kumar, R., Jaggi, M., Bawa, S. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *European Journal of Medicinal Chemistry* **97**, 871–910 (2015).
74. Shreder, K. R. Lin, E. C., Wu, J., Cajica, J., Amantea, C. M., Hu, Y., Okerberg, E., Brown, H. E., Pham, L. M. Synthesis and structure-activity relationship of (1-halo-2-naphthyl) carbamate-based inhibitors of KIAA1363 (NCEH1/AADACL1). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **22**, 5748–5751 (2012).
75. Petrillo, G. Marigiò, M. A., Aiello, C., Cordazzo, C., Fenoglio, C., Morganti, S., Croce, M., Rizzato, E. Design, synthesis, and in vitro evaluation of new naphthylnitrobutadienes with potential antiproliferative activity: Toward a structure-activity correlation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **16**, 240–247 (2008).
76. Salum, L. B. Mascarello, A., Canevarolo, R. R., Altei, W. F., Laranjeira, A. B., Neuenfeldt, P. D., Stumpf, T. R. N-(1'-naphthyl)-3,4,5-trimethoxybenzohydrazide as microtubule destabilizer: Synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and *in vivo* activity against acute lymphoblastic leukemia. *European Journal of Medicinal Chemistry* **96**, 504–518 (2015).
77. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. y Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 935–949 (2004).
78. Escuin, D., Burke, P. A., McMahon-Tobin, G., Hembrough, T. A., Wang, Y., Alcaraz, A. A., Leandro García, L. J., Rodríguez Antona, C., Snyder, J. P., Lavalley, T. M., y Giannakakou, P. The hematopoietic specific  $\beta$ 1-tubulin is naturally resistant to 2-methoxyestradiol and protects patients from drug induced myelosuppression. *Cell Cycle* **8**, 3914–3924 (2009).
79. Leandro García, L. J., Leskelä, S., Inglada Pérez, L., Landa, I., de Cubas, A.

- A., Maliszewska, A., Comino Méndez, I., Letón, R., Gómez Graña, Á., Torres, R., Ramírez, J. C., Álvarez, S., Rivera, J., Martínez, C., Lozano, M. L., Cascón, A., Robledo, M., Rodríguez Antona, C. Hematologic  $\beta$ -tubulin VI isoform exhibits genetic variability that influences paclitaxel toxicity. *Cancer Research* **72**, 4744–4752 (2012).
80. Fiebig, H. H. y Burger, A. M. Patient derived tumor models and explants. In: Tumor models in cancer research. *Cancer Drug Discovery and Development*. E.E.U.U. Online ISBN 978-1-60761-968-0 (2011).
81. Andrew Goodspeed, Laura M. Heiser, Joe W. Gray, J. C. Tumor derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics. *Molecular Cancer Research* **14**, 3–13 (2016).
82. Allen, D. D., Caviedes, R., Cárdenas, A. M., Shimahara, T., Segura Aguilar, J., Caviedes, P. A. Cell lines as models for drug screening and toxicity studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **31**, 757–768 (2005).
83. American Type Culture Collection (ATCC). Disponible en: <https://www.atcc.org/>. Consultado el 1º de julio, 2017.
84. Aguayo Ortiz, R., Cano González, L., Castillo, R., Hernández Campos, A. y Dominguez, L. Structure-based approaches for the design of benzimidazole-2-carbamate derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design* **90**, 40–51 (2017).
85. Hopfinger, A. J. Computer assisted drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **28**, 1133–1139 (1985).
86. Jorgensen, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science* **303**, 1813–1818 (2004).
87. Refaat, H. M. Synthesis and anticancer activity of some novel 2-substituted benzimidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **45**, 2949–2956 (2010).
88. Sherer, C. y Snape, T. J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope

- of indole and carbazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* **97**, 552–560 (2015).
89. Valdez, J., Cedillo, R., Hernández Campos, A., Yépez, L., Hernández Luis, F., Navarrete Vázquez, G., Tapia, A., Cortés, R., Hernández, M., Castillo, R. Synthesis and antiparasitic activity of 1*H*-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **12**, 2221–2224 (2002).
90. Katiyar, S. K., Gordon, V. R., McLaughlin, G. L. y Edlind, T. D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with  $\beta$ -tubulin sequence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**, 2086–2090 (1994).
91. The PubChem Project. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Consultado el 1° de Enero, 2018.
92. Salgado Bustos, P. Síntesis y actividad antiparasitaria de análogos del 1-*H*-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo. (Tesis de maestría). *Facultad de Química. UNAM*, 2008).
93. Hernández-Campos, A., Ibarra Velarde, F., Vera Montenegro, Y., Rivera Fernández, N. y Castillo, R. Synthesis and fasciolicidal activity of 5-Chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*-benzimidazole. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **50**, 649–652 (2002).
94. Pérez-Melero, C., Maya, A. B., del Rey, B., Peláez, R., Caballero, E., Medarde, M. A new family of quinoline and quinoxaline analogues of combretastatins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **14**, 3771–3774 (2004).
95. Hsueh Yun, L., Jang Yang, C., Chih Ying, N., Ching Chuan, K., Kuang Hsing, S., Chun Hsein, W. 5-Amino-2-arylquinolines as highly potent tubulin polymerization inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **53**, 2309–2313 (2010).
96. Schmidt, T., Bergner, A. y Schwede, T. Modelling three dimensional protein structures for applications in drug design. *Drug Discovery Today* **19**, 890–897 (2014).

97. Raies, A. B. y Bajic, V. B. *In silico* toxicology: Computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Computational Molecular Science* **6**, 147–172 (2016).
98. Hall, A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**, 5–14 (2009).
99. Gascoigne, K. E. y Taylor, S. S. How do antimitotic drugs kill cancer cells. *Journal of Cell Science* **122**, 2579–2585 (2009).
100. Tsuda, Y., Iimori, M., Nakashima, Y., Nakanishi, R., Ando, K., Ohgaki, K., Kitao, H., Saeki, H., Oki, E., y Maehara, Y. Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora B during tubulin binding agent induced mitotic arrest. *Scientific Reports* **7**, 1–12 (2017).
101. Donaldson, J. G. Immunofluorescence Staining. *Current protocols in cell biology* **4**, 1–9 (2001).
102. Cheng, B. y Crasta, K. Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocrine Related Cancer* **24**, 797–7106 (2017).
103. Yasuhira, S., Shibazaki, M., Nishiya, M. y Maesawa, C. Paclitaxel induced aberrant mitosis and mitotic slippage efficiently lead to proliferative death irrespective of canonical apoptosis and p53. *Cell Cycle* **15**, 3268–3277 (2016).
104. Elhajouji, A., Cunha, M. y Kirsch Volders, M. Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis* **13**, 193–198 (1998).
105. Hashimoto, K. y Todo, T. Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid. *Mutagenesis* **28**, 457–464 (2013).
106. Shelanski, M. L., Gaskin, F. y Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**, 765–8 (1973).
107. Lodish, H., Berk, A. Microtubule dynamics and associated proteins.

Molecular Cell Biology (2000). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21522/>. Consultado: 1° febrero, 2018.

108. Cytoskeleton Inc.<sup>®</sup> Tubulin polymerization assay kit. Manual **1**, 1–18 (2011).
109. Vasquez, R. J., Howell, B., Yvon, A. M., Wadsworth, P. y Cassimeris, L. Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability *in vivo* and *in vitro*. *Molecular Biology of the Cell* **8**, 973–985 (1997).
110. Coté, R. J. Sterilization and filtration. *Current Protocols in Cell Biology* **4**, 1–21 (1999).
111. Brand.<sup>®</sup> Counting chambers. *Cinical Laboratory Brand Inc.* **49**, 253–256 (2016).
112. Invitrogen.<sup>®</sup> Cell culture basics. *ThermoFisher Scientific Inc.* **1**, 1–61 (2010).
113. American Type Culture Collection (ATCC). MTT cell proliferation assay. Manual **1**, 1–6 (2011).
114. Amersham.<sup>®</sup> Ficoll-Paque PLUS for *in vitro* isolation of lymphocytes. Handbooks from Amersham Biosciences. **1**, 1–20 (2002).
115. Odell, I. D. y Cook, D. Immunofluorescence techniques. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* **1**, 189–200 (1981).

# ANEXO I. CARTEL PRESENTADO EN LA XVIII REUNIÓN INTERNACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS

Parte del presente proyecto de tesis se presentó por el sustentante bajo la modalidad de cartel como parte de la celebración de la XVIII Reunión Internacional de Ciencias Médicas, misma que se celebró en la ciudad de León, Guanajuato, del 17 al 20 de abril del año 2018.



## Actividad citotóxica de derivados bencimidazólicos sintetizados como inhibidores de la polimerización de la $\beta$ -tubulina



Ariana Romero-Velasquez<sup>1</sup>, Lucía Cano-González<sup>2</sup>, Marco Antonio Cerbón-Cervantes<sup>1</sup>, Alicia Hernández-Campos<sup>2</sup>, Rafael Castillo-Bocanegra<sup>2</sup>, Ignacio González-Sánchez<sup>2,3</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Biología y <sup>2</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM, CDMX 04510, México. <sup>3</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, CDMX 04960, México.

### Introducción

Los microtúbulos están formados por la agregación lateral de protofilamentos, cada uno de los cuales se componen dímeros estables de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina. Los compuestos que tienen como diana a los microtúbulos ocasionan alteraciones en procesos que son fundamentales para la estabilidad y supervivencia celular, tal es la razón por la que resultan un blanco muy atractivo en la terapéutica contra el cáncer.<sup>1,2</sup>

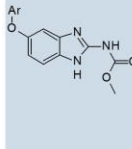






Los fármacos albendazol, fenbendazol y mebendazol son derivados de bencimidazol que han demostrado buen potencial para inhibir la proliferación de diferentes líneas tumorales, por este motivo han sido seleccionados como compuestos de referencia del presente proyecto.<sup>3,4</sup>

Con base en lo anterior, el grupo de investigación del Dr. Castillo-Bocanegra, realizó la síntesis de seis derivados del 1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo, cuyas características estructurales podrían favorecer su unión con la  $\beta$ -tubulina, alterando así la dinámica de los microtúbulos y con esto aumentar la muerte de las células tumorales.<sup>5</sup>

### Objetivo

Determinar la citotoxicidad en líneas celulares tumorales de la serie de derivados bencimidazólicos LCG (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura de la serie LCG

Núcleo	LCG	Ar	LCG	Ar
	1		4	
	2		5	
	3		6	

### Metodología

La determinación de la viabilidad celular se realizó con el método de MTT en líneas celulares SK-LU-1 de cáncer de pulmón, SW620 de colon, y MCF-7 de cáncer de mama. Se sembraron 4,000 células por pozo en placas de 96 pozos empleando medio DMEM enriquecido con SFB al 10%. Estas células fueron incubadas en presencia de los bencimidazoles LCG y las referencias mencionadas durante 72 h a concentraciones de 0.01 - 10  $\mu$ M y se mantuvieron en contacto con las células a 37 °C y una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### Resultados y discusión

Tabla 2. Citotoxicidad de la serie LCG en líneas celulares tumorales

Compuesto	Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)		
	SK-LU-1	SW620	MCF7
LCG1	0.076±0.005	0.082±0.006	>10
LCG2	1.5±0.05	1.7±0.11	>10
LCG3	1.5±0.10	1.3±0.06	>10
LCG4	2.1±0.10	3.9±0.09	>10
LCG5	0.6±0.001	0.8±0.02	>10
LCG6	7.9±0.26	19.6± 0.87	>10
Albendazol	0.5±0.03	0.5±0.03	>10
Fenbendazol	0.5±0.04	0.6±0.02	>10
Mebendazol	0.5±0.04	0.6±0.05	>10

Los derivados LCG1 y LCG5 resultaron ser los compuestos más activos de la serie LCG tanto en la línea celular SK-LU-1 como en SW620. Dado que comparten la sustitución aromática del tipo naftilo, se observa que la inclusión este sustituyente parece favorecer la actividad citotóxica de la serie LCG.

La actividad citotóxica del derivado LCG1 sobre las líneas antes mencionadas resultó ser seis veces superior a la de las referencias farmacológicas empleadas, sin embargo ningún compuesto de la serie LCG tuvo actividad contra la línea celular MCF7.

### Conclusiones

- Los derivados de la serie LCG presentaron actividad citotóxica contra las líneas celulares SK-LU-1 y SW620.
- El derivado LCG1 resultó ser el compuesto más citotóxico de la serie y su actividad es mayor a la de los fármacos de referencia, convirtiéndose así en un compuesto *hit* para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos y para ser evaluado en estudios preclínicos.

### Agradecimientos

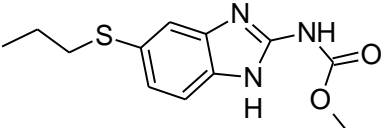
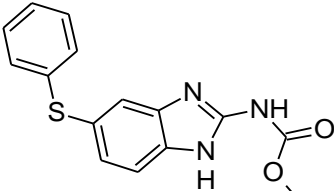
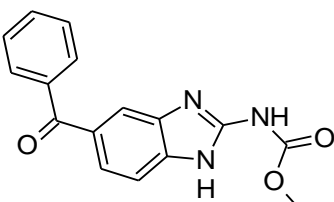
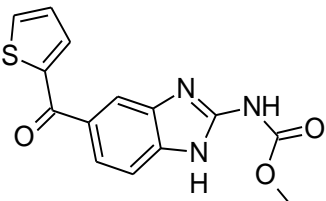
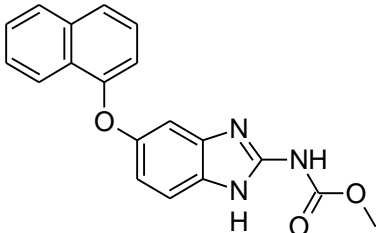
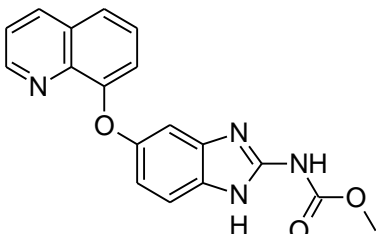
Este proyecto fue financiado por DGAPA PAPIIT 221416, UNAM y CONACyT 251726, CDMX, México.

### Referencias

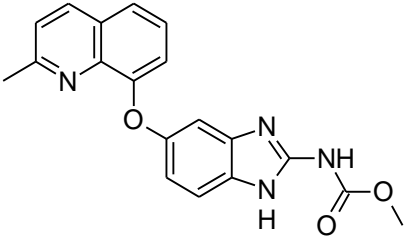
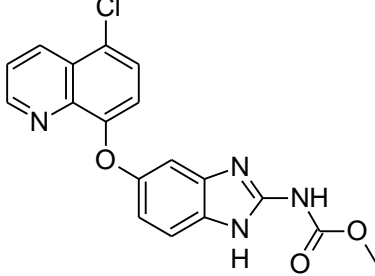
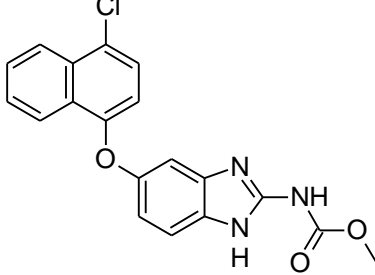
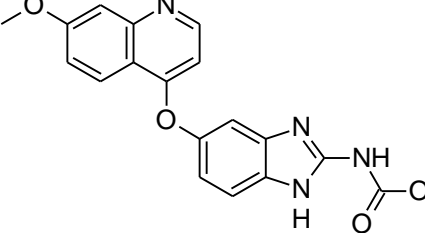
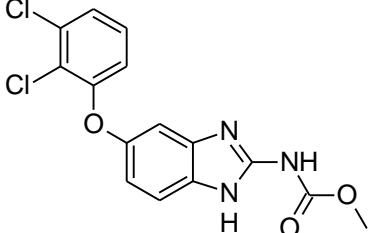
- Wang, Y. et al. FEBS J. 283, 102–111 (2016).
- Guan, Q. et al. Eur. J. Med. Chem. 87, 306–315 (2014).
- Pourgholami, M. H. et al. Cancer Lett. 165, 43–49 (2001).
- Dogra, N., Mukhopadhyay, T. J. Biol. Chem. 287, 30625–30640 (2012).
- Aguayo-Ortiz, R., et al. Chem. Biol. Drug Des. 90, 40–51 (2017).

Correspondencia: ignacio.gonzalez.s@gmail.com

## ANEXO II. ESTRUCTURA DE LOS DERIVADOS BENCIMIDAZÓLICOS

Compuesto	Clave	Estructura
Albendazol	ABZ	
Fenbendazol	FBZ	
Mebendazol	MBZ	
Nocodazol	NZ	
<i>N</i> -[5-(naftil-1-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG1	
<i>N</i> -[5-(quinolin-8-iloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	LCG2	



<p><i>N</i>-[5-(2-metilquinolin-8-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo</p>	<p>LCG3</p>	
<p><i>N</i>-[5-(5-cloroquinolin-8-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo</p>	<p>LCG4</p>	
<p><i>N</i>-[5-(4-cloronaftil-1-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo</p>	<p>LCG5</p>	
<p><i>N</i>-[5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo</p>	<p>LCG6</p>	
<p><i>N</i>-[5-(2,3-diclorofenoxi)-1<i>H</i>-bencimidazol-2-il]carbamato de metilo</p>	<p>PBS90</p>	

### ANEXO III. CULTIVO CELULAR

#### Preparación de soluciones Amortiguadoras: PBS 1X, PBS-EDTA 1X

1. Se disolvió la cantidad de cada compuesto indicada a continuación en 800 mL de agua desionizada y se realizó el ajuste del pH de la solución resultante a 7.4.

Solución PBS 1X		
Compuesto	Cantidad	Concentración
NaCl	8.0 g	136.9 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	1.76 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	10.14 mM
KCl	0.2 g	2.68 mM
H <sub>2</sub> O desionizada	1000 mL	

Solución PBS-EDTA 1X		
Compuesto	Cantidad	Concentración
NaCl	8.0 g	136.9 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g	1.8 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g	10.1 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
EDTA	0.372 g	1.0 mM
H <sub>2</sub> O desionizada	1000 mL	

- Después de ajustar el pH de esta solución se llevó a la marca del aforo de 1 L con agua desionizada y posteriormente se esterilizó empleando un sistema de filtración equipado con una membrana cuyo diámetro de poro es de 0.22  $\mu\text{m}$ .
- Una vez filtradas las soluciones se almacenaron en un recipiente estéril y se mantuvieron a temperatura ambiente.

### Preparación del Medio de Cultivo

- Se disolvió la cantidad de sales indicadas a continuación en 700 mL de agua desionizada estéril.

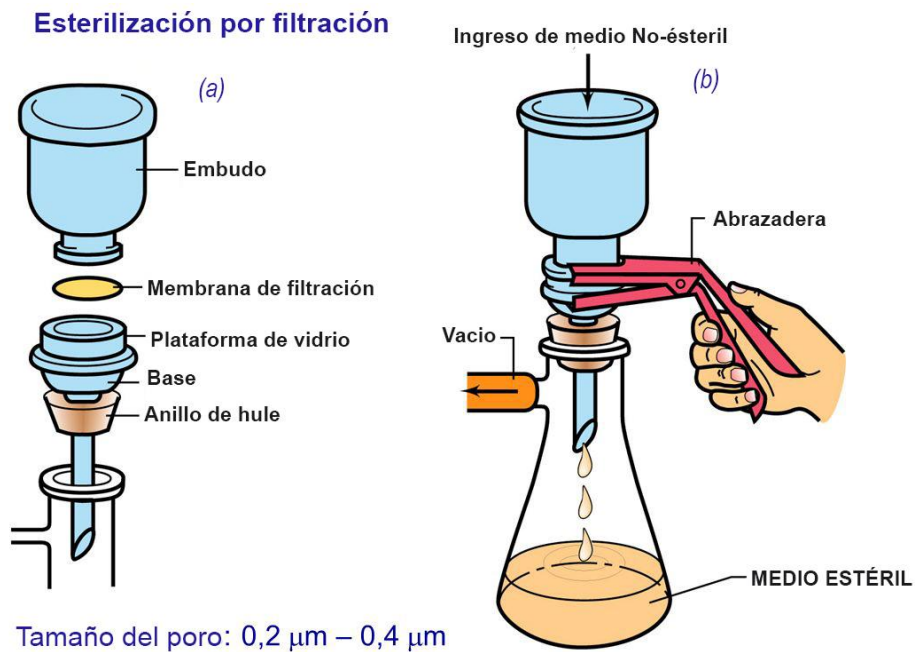
<b>Sistema amortiguador</b>		
Compuesto	Cantidad	Concentración
HEPES	2.2 g	9.23 mM
NaHCO <sub>3</sub>	3.7 g	44.04 mM
H <sub>2</sub> O desionizada estéril	700 mL	

- El contenido de un sobre con medio de cultivo en polvo DMEM, bajo en glucosa (GIBCO-Invitrogen®) se disolvió en el agua desionizada y estéril, que contiene el sistema amortiguador indicado con anterioridad. El contenido del sobre se enjuagó con 50 mL adicionales de agua desionizada y estéril para evitar pérdidas y garantizar la concentración de nutrientes requerida.

3. Al medio de cultivo disuelto en el sistema amortiguador se le añadieron las siguientes soluciones comerciales (GIBCO-Invitrogen®). Este paso debe realizarse estrictamente en la campana de flujo laminar.

Solución comercial	Volumen
Aminoácidos no esenciales (100X)	10 mL
Piruvato de sodio (100 mM)	10 mL
Mezcla de antibiótico y antimicótico (100X)	10 mL

4. La solución resultante se agitó con una barra magnética y se adicionaron 120 mL de agua desionizada y estéril. En este punto el volumen de la solución es de 900 mL.
5. El medio de cultivo obtenido se esterilizó empleando un sistema de filtración equipado con una membrana cuyo diámetro de poro es de 0.22  $\mu\text{m}$  como se señala en el esquema de la Figura I.



**Figura I.** Representación esquemática del sistema de esterilización por filtración. (a) Componentes del sistema, (b) Procedimiento de esterilización por filtración.<sup>110</sup>

6. Finalmente se adicionó suero fetal bovino (SFB) hasta llegar a una concentración final del 10 %, a este suero previamente se le inactivó el complemento manteniéndolo a una temperatura de 56 °C durante 1 h. Cada vez que se realizó la adición de SFB se tomó una alícuota de 4 mL del medio de cultivo resultante y se colocó en una caja Petri con el fin de comprobar la esterilidad del medio.

## **TÉCNICAS EXPERIMENTALES: CULTIVO CELULAR**

Los procedimientos enlistados a continuación se realizaron en campana de flujo laminar y con material estéril.

### **Descongelamiento de células**

1. Los viales de congelamiento se almacenaron a -70 °C con ayuda de un equipo ultracongelador.
2. Se tomó el vial de interés y se descongeló lentamente a 25 °C.
3. Una vez descongelado y homogeneizado, el vial se centrifugó a 800 rpm durante 5 min para descartar el agente crioprotector en el que las células se hayan embebidas.
4. El botón celular se resuspendió con 1 mL de medio completo y se transfirió a una placa Petri
5. Se añadieron 2 mL adicionales de medio completo y las células se mantuvieron en incubación a 37 °C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> del 5 %.

### **Lavado y desprendimiento de cultivos adherentes**

1. Por decantación o con una micropipeta se retiró el medio de cultivo remanente en las cajas Petri, mismo que se desechó en un recipiente para residuos que contenía hipoclorito de sodio al 35 %.
2. Se realizaron lavados con 2 mL de solución estéril de PBS.

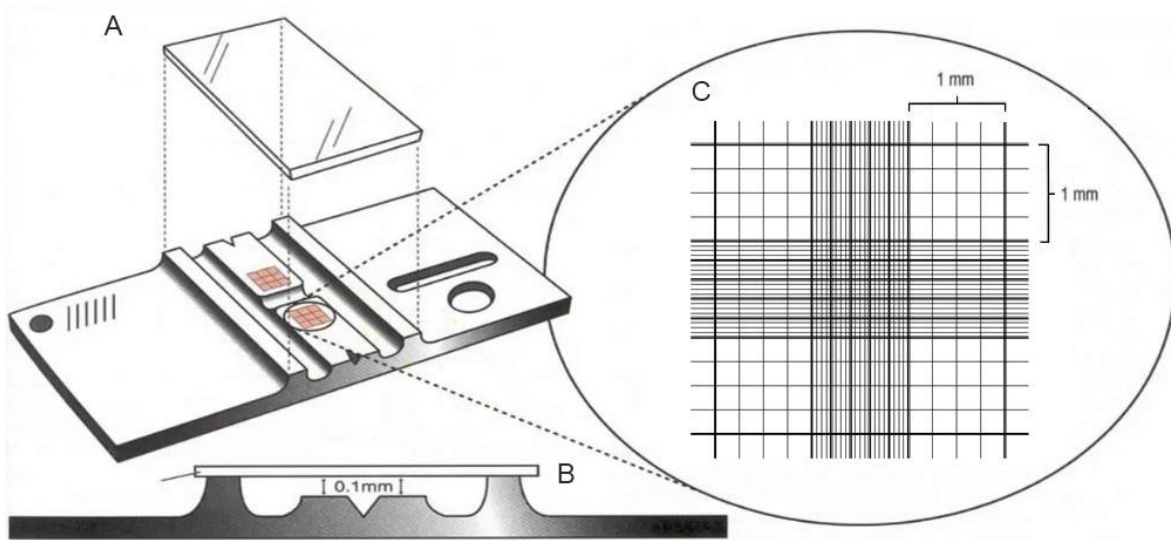
3. Por decantación o usando una micropipeta se retiró el PBS adicionado en el paso anterior con el fin de adicionar 2 mL de solución estéril de PBS-EDTA.
4. Las células en contacto con la solución de PBS-EDTA se incubaron a 37 °C durante 5 min.
5. Al término del periodo de incubación se retiró el PBS-EDTA remanente, este paso se realizó exclusivamente con ayuda de la micropipeta de 1mL.
6. Se adicionaron 2 mL de medio de cultivo estéril y el desprendimiento de las células se realizó mecánicamente con ayuda de una micropipeta. Fue importante asegurarse de que no quedasen células adheridas en la placa.
7. Con la alícuota resultante fue posible realizar la propagación del cultivo, hacer un pase a otra caja, o bien, mantener la confluencia celular deseada.

### **Congelamiento de células**

1. Se desprendió con solución de PBS-EDTA la cantidad de células contenidas en una caja Petri de 10 cm de diámetro, la confluencia mínima necesaria para la realización de este procedimiento fue del 75 %.
2. Se produjo una suspensión celular de 5 mL con una concentración aproximada de  $1 \times 10^6$  células/mL, la cual se transfirió a tubos cónicos para su centrifugación a 800 rpm y 5 min.
3. El botón celular obtenido se resuspendió con 5 mL de medio de congelamiento, el cual estuvo conformado por medio completo adicionado con el 5 % de DMSO como agente crioprotector.
4. Se transfirieron los 5 mL de la suspensión celular obtenida en el paso anterior a 5 viales de congelamiento, el volumen final de cada vial fue de 1 mL.
5. En cada vial de congelamiento se indicó el nombre de la línea celular, la fecha en la que se realizó el procedimiento y el nombre del analista que realizó el procedimiento.
6. Los viales de congelamiento se almacenan a -70 °C con ayuda de un equipo ultracongelador.

## Conteo de células en cámara de Neubauer

En este procedimiento se determina la concentración de una suspensión celular (células/mL) a partir de la media aritmética de las células refringentes presentes en cuadrantes de 0.01 cm<sup>2</sup> de área. Para este procedimiento se realizó la limpieza del sistema de conteo, mismo que está conformado por la cámara de Neubauer (BRAND®) y el cubre objetos, con una solución de etanol al 70 % empleando tela suave.



**Figura II.** Representación esquemática de la cámara de Neubauer. A. Colocación del cubreobjetos. B. Vista lateral del sistema de conteo. C. Área de conteo.<sup>111</sup>

1. Se colocó el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer de acuerdo con el esquema señalado en la Figura II. Fue importante asegurarse que este sistema se mantuviese en posición horizontal sobre la mesa de trabajo.
2. Se adicionó una alícuota 10  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular que contenía aproximadamente de  $3 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células/mL sobre el extremo externo de la cámara de Neubauer.
3. Se permitió que el líquido ingresase a la cámara por capilaridad hasta que formó una película homogénea. En caso de que existiera la presencia de burbujas o se hubiese perdido volumen de la alícuota, fue necesario repetir la operación.

4. El conteo celular se realizó en 4 u 8 de los cuadrantes de 0.1 cm de longitud de la cámara de Neubauer.
5. El área de un cuadro de 0.1 cm de longitud es  $(0.1 \text{ cm}) \times (0.1 \text{ cm}) = 0.01 \text{ cm}^2$  de superficie, por lo tanto su volumen es de:

$$(0.01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie}) * (0.01 \text{ cm de profundidad}) = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ mL}$$

6. La ecuación que describe el número de células en un cuadro de 0.1 cm de longitud es:

Número de células contadas \* 10,000 / número de cuadrantes usados en la cuenta

### **Cultivo de células en placa de 96 pozos**

1. Partiendo de un cultivo con buena confluencia y viabilidad celular se realizó el desprendimiento de la monocapa adherente siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad.  
En un tubo de radiofuga, o en tubos cónicos estériles, se agregaron 5 mL de medio de cultivo y se realizó una suspensión celular con el fin de determinar la cantidad exacta de células presentes en esta suspensión empleando una cámara de Neubauer.
2. Una vez que se determinó el número de células contenidas en la suspensión del paso anterior, se realizaron los cálculos necesarios para realizar la siembra de 4,000 células por pozo, considerando un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en cada pozo y un exceso de 110 pozos totales. Este volumen fue colocado en una canaleta estéril que permitió realizar la homogenización constante durante el procedimiento.
3. Las placas de 96 pozos se sembraron con 200  $\mu\text{L}$  de una suspensión de 4,000 células/mL empleando una micropipeta multicanal.
4. Finalizada la siembra, las placas se incubaron a 37°C y se mantuvieron así hasta que las células se adhirieron a la placa.
5. Estas placas fueron empleadas en ensayos de citotoxicidad.



## Administración del tratamiento

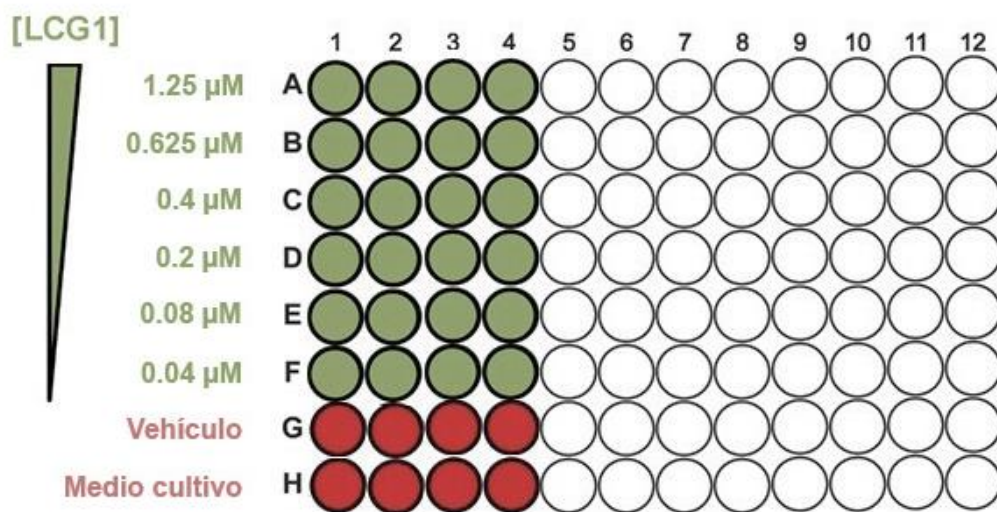
A continuación se indica una cantidad de masa sugerida a pesar del compuesto LCG1 y los pasos necesarios para construir una curva dosis-efecto de viabilidad celular en placas de 96 pozos (0.32 cm<sup>2</sup> de área). La dilución 1:40 se realizó tomando 25 µL del stock y se llevaron a un volumen final de 1,000 µL de DMSO.

Compuesto	LCG1
PM (g/mol)	333.3
Cantidad (mg)	0.9
Volumen Stock (µL)	150
Stock (µM)	17999
<b>Dilución 1:40 (µM)</b>	450

1. Partiendo de la dilución 1:40 se realizan los cálculos necesarios para obtener 6 tubos a una concentración 5X, respecto a la concentración en los pozos de tratamiento.
2. A continuación se muestra la estrategia que se siguió para el compuesto LCG1, en este caso se consideró que la administración se realizó con una alícuota de 50 µL a 13 pozos. Es necesario observar que el vehículo empleado para cada tratamiento fue DMSO y éste último no sobrepasó una concentración de 0.7 % en los pozos de tratamiento.

Tubo	5X (µM)	Tratamiento (µM)
<b>1</b>	6.3	1.25
<b>2</b>	3.1	0.625
<b>3</b>	2.0	0.4
<b>4</b>	1.0	0.2
<b>5</b>	0.4	0.08
<b>6</b>	0.2	0.04

3. Se observa que además de los 6 tubos de tratamiento, es necesario incluir 2 tubos adicionales como control de vehículo y control de esterilidad del medio de cultivo empleado.
4. Empleando una placa de 96 pozos en las que previamente se sembraron 4,000 células por pozo, se administran 50  $\mu\text{L}$  del contenido del tubo 1 en la fila A. El contenido del tubo 2 se administra en la fila B, y así sucesivamente. El control del vehículo se añade a la fila G, mientras que el control del medio de cultivo se administra en la fila H. (Figura III)
5. Al realizar la administración de esta manera se obtuvieron placas cuyas filas A, B, C, D, E, F, G, H, contienen concentraciones decrecientes del compuesto administrado, mientras que las columnas corresponden a repeticiones sucesivas de la concentración administrada. (Figura III)



**Figura III.** Esquema de administración del tratamiento en placa de 96 pozos.<sup>112</sup>

## Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante el método de MTT, donde se determinó la densidad óptica del formazán a 540 nm. En esta metodología la intensidad de la coloración asociada al formazán, es directamente proporcional a la viabilidad celular. (Figura IV)

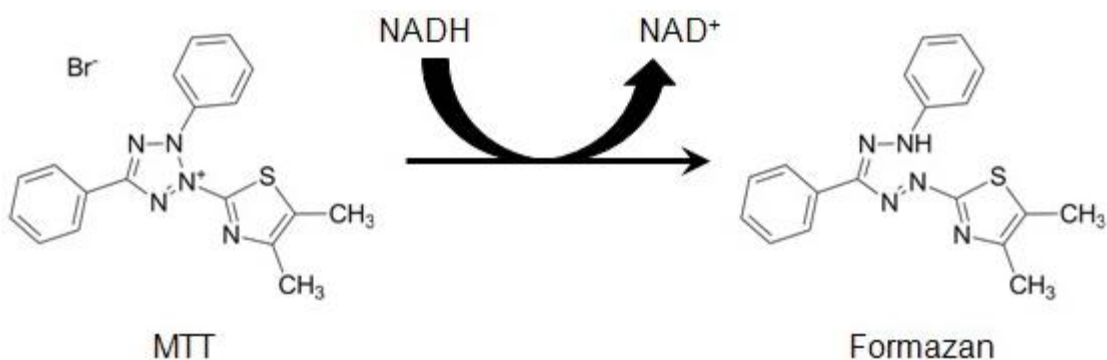


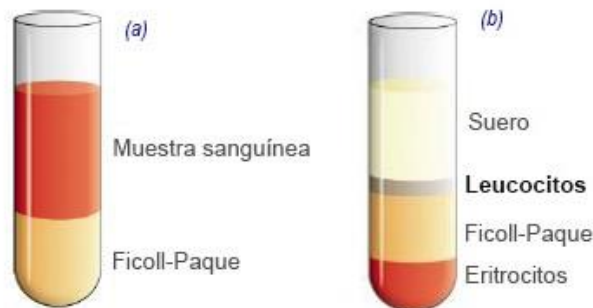
Figura IV. Reducción metabólica del MTT.<sup>113</sup>

En un ensayo de citotoxicidad la  $Cl_{50}$  de un compuesto corresponde a la concentración requerida del mismo para producir el 50% de inhibición de la viabilidad celular, por lo tanto, en estas evaluaciones los compuestos con una menor  $Cl_{50}$  son aquellos que presentan mayor actividad.

1. En las placas de 96 pozos se realizó la adición de 20  $\mu$ L de una solución de MTT que previamente se preparó a una concentración de 2.5 mg/mL con una solución de PBS, posteriormente, se dejó incubando la placa a 37 °C durante 1.5 h.
2. Después de verificar la precipitación de los cristales de formazán al fondo del pozo, fue necesario retirar el medio de cultivo de las placas empleando una micropipeta multicanal. En este paso fue importante evitar la extracción accidental de cristales.
3. Se adicionaron 200  $\mu$ L de DMSO a los pozos y con la micropipeta se obtuvo una solución homogénea.
4. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro de placas a una longitud de onda de 540 nm.

## Obtención de leucocitos de sangre periférica

1. Por venopunción de donadores adultos sanos en condiciones de ayuno mínimo de 6 h o máximo de 8 h, se obtuvieron de 25 a 30 mL de sangre periférica usando el sistema vacutainer con EDTA (Becton Dickinson Vacutainer® # 367863). Posteriormente se realizó una suspensión 1:1 de esta sangre con PBS en un tubo cónico de 50 mL.
2. En tubos cónicos de 15 mL se agregaron 4 mL de ficoll (Ficoll-Paque PLUS® GE Healthcare) y 6 mL de la suspensión sanguínea 1:1, misma que se añadió lentamente y por goteo sobre las paredes del tubo. Los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 40 min. Al termino de esta separación se obtuvieron 4 fases visibles (Figura V): La fase inferior de color rojo intenso corresponde a los eritrocitos y plaquetas; sobre esta fase es posible apreciar una fase traslúcida de Ficoll, seguida de un fino anillo turbio que corresponde a los leucocitos; y por encima de este anillo, hay una fase amarillenta traslúcida de suero. El anillo de leucocitos fue la fracción de interés.



**Figura V.** Aislamiento de leucocitos de sangre periférica. (a) Al Ficoll-Paque se le añade por goteo la suspensión 1:1 de eritrocitos. (b) Después de un periodo de centrifugación se obtienen diversas fases y los leucocitos corresponden a la fracción celular de interés.<sup>114</sup>

3. Haciendo uso de pipetas Pasteur estériles, se colectó la fracción de interés y se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 mL. A esta fracción de leucocitos se le adicionaron 5 mL de PBS y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min.

4. El botón celular obtenido se resuspendió en 5 mL de una solución de PBS y se centrifugó nuevamente a 800 rpm durante 5 min. Esta operación se repitió dos veces más.
  
5. Al finalizar el último lavado se descartó el sobrenadante del tubo empleando una pipeta Pasteur, y el botón celular se resuspendió con 6 mL de medio RPMI-1640 complementado con el 10% de SFB (GIBCO-Invitrogen®). Esta suspensión celular fue contada en cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento ya descrito.

## **ANEXO IV. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA**

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia BX41 (Olympus®, Tokio, Japón) equipado con filtros cromáticos para las señales DAPI y FITC.

### *A. Lavado de cubreobjetos circulares*

1. El primer lavado se realizó con una solución libre de fosfatos de Dextran® al 10 % aplicando agitación orbital durante 20 min.
2. Posteriormente se realizaron 2 lavados con agua Mili-Q® en agitación orbital durante 15 min.
3. Se empleó una solución de ácido acético al 10 % en agua Mili-Q® para desengrasar la superficie de los cubreobjetos en agitación orbital por 15 min.
4. Los cubreobjetos se secaron con gradientes de soluciones etanólicas que fueron aplicadas en ciclos de agitación orbital de 15 min, tal como se describe a continuación: EtOH 70 %, EtOH 80 %, EtOH 96 %. Finalmente, estos cubreobjetos se dejaron reposar en una solución de etanol absoluto durante una noche completa.

### *B. Siembra en placas de cultivo*

Se sembraron 45,000 células SK-LU-1 por placa, en cajas Petri de 35 x 10 mm. En estas placas se administraron el derivado LCG1 y nocodazol a una concentración de 0.08 µM.

### C. Tinción directa



**Figura VI.** Representación esquemática de la tinción directa. Se señala el modo de unión de un anticuerpo primario marcado con un fluorocromo determinado a su antígeno.<sup>115</sup>

1. El medio de cultivo sobrenadante se retiró con ayuda de una micropipeta y la monocapa celular se lavó con un volumen adecuado de PBS.
2. Las células se fijaron químicamente a temperatura ambiente con 1 mL de una solución de p-formaldehído (PAF) al 4 % en PBS durante 20 min.
3. La solución de PAF se retiró con ayuda de una micropipeta y se realizaron dos lavados de la monocapa celular con 1 mL de PBS.
4. Para permeabilizar la membrana de los cultivos, éstos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min en presencia de 1 mL de una solución 1:1 que contenía SDS (Aldrich®) 0.5 % y Triton X-100 (Aldrich®) al 0.5 % en PBS.
5. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS.
6. Se bloqueó la monocapa celular con una solución que contenía BSA al 3 % en PBS, durante 1 h y a temperatura ambiente.
7. Se realizaron tres lavados adicionales con PBS.
8. La inmunotinción se realizó por 1 h con 100  $\mu$ L de una dilución 1:500 del anticuerpo monoclonal GeneTex® conjugado con fluoresceína, este anticuerpo está dirigido hacia  $\beta$ -tubulina (GeneTex®, GTX11310).

9. La tinción de los núcleos celulares se realizó con 100  $\mu$ L de una dilución 1:500 del colorante DAPI durante 1 h. NOTA: Fue importante asegurar la humedad de las películas de tinción durante este procedimiento, así como proteger la fluorescencia con oscuridad.
10. Al término del periodo de incubación con el anticuerpo y de la tinción de los núcleos, se realizaron cinco lavados con PBS y dos lavados adicionales con agua destilada.
11. La superficie teñida del cubreobjetos circular se pone en contacto sobre un portaobjetos previamente limpio y desengrasado, al que le añadieron 10  $\mu$ L de una solución 1:500 del protector de fluorescencia Vecta-Shield (Sigma-Aldrich®). NOTA: Las preparaciones se protegieron de la luz ambiental.
12. Para la visualización y captura de imágenes, las observaciones microscópicas se realizaron en las longitudes de excitación adecuadas.



## ANEXO V. POLIMERIZACIÓN *IN VITRO* DE TUBULINA

Haciendo uso del kit de polimerización de la tubulina *in vitro* Cytoskeleton (Cytoskeleton® # BK006P), se realizó la construcción de curvas de polimerización en presencia de la referencia farmacológica nocodazol, o del derivado LCG1, como a continuación se describe.

### A. Configuración del equipo instrumental

El espectrofotómetro de placas Epoch 2®, se configuró en modo cinético para realizar lecturas cada minuto durante 1 h a 340 nm, manteniendo una temperatura de reacción de 37 °C y con una agitación inicial de tipo orbital de 3 s de duración. Así mismo, se tuvo la consideración de asignar la lectura espectrofotométrica a una placa de 96 pozos de media área.

### B. Procedimiento Experimental

1. La placa se precalentó a 37 °C durante 30 min antes de comenzar el ensayo.
2. Se introdujeron los parámetros de lectura en el lector de placas. Una vez que la tubulina se depositó en los pozos de reacción a 37 °C, la lectura se realizó inmediatamente.
3. Se preparó un volumen apropiado de la solución amortiguadora general a 4 °C, como se indica en la tabla correspondiente.

Solución	Volumen (µL)	Concentración final
Amortiguador general de Tubulina	750	80mM PIPES, pH=6.9 2mM MgCl <sub>2</sub> , 0.5mM EGTA
Glicerol en amortiguador general de tubulina	250	15%
Stock de GTP	10	1mM GTP

NOTA: Para realizar la constitución de las soluciones amortiguadoras así como el ensayo de polimerización, se siguieron las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Los pozos de reacción, se mantuvieron las concentraciones finales propuestas de 3 mg/mL de tubulina en 80 mM de PIPES, pH= 6.9, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP y 10 % glicerol.

4. Para realizar la dilución de los compuestos de interés se mantuvo un volumen apropiado de la solución amortiguadora general de Tubulina (TP) a temperatura ambiente.
5. Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución TP en dos pozos sin compuesto (controles), posteriormente se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de la concentración 10X de los compuestos de interés en los pozos siguientes, mismos que se hallaban previamente disueltos en la solución TP.
6. Se incubó la placa a 37 °C durante 2 min.
7. Se descongeló un vial de 200  $\mu\text{L}$  del stock de tubulina colocándolo en un baño de agua a temperatura ambiente hasta que la proteína se encontró completamente en fase líquida. El paso de descongelación rápida es crítico dado que la tubulina puede comenzar su polimerización a temperatura ambiente.
8. El stock de tubulina se diluyó y mezcló con 420  $\mu\text{L}$  de la solución TP que se preparó previamente a 4 °C. Esta solución de tubulina diluida fue empleada inmediatamente.
9. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de la proteína diluida en cada uno de los pozos de reacción con ayuda de una micropipeta multicanal. NOTA: Fue necesario realizar este paso a una velocidad de pipeteo mediana y con la punta de la pipeta en contacto con la pared del pozo. Esta técnica evitó la formación de burbujas que alterasen las lecturas de absorbencia.
10. La lectura espectrofotométrica se realizó inmediatamente después de añadir tubulina en cada pozo.

### *C. Esquema de dilución de los compuestos de interés*

A continuación se mostrará una tabla que muestra la cantidad de masa sugerida a pesar del NZ y los pasos necesarios para construir una curva de polimerización. La dilución 1:30 se realiza tomando 30  $\mu\text{L}$  del stock, el cual se llevaran a un volumen final de 1,000  $\mu\text{L}$  DMSO; mientras que la dilución 1:100 se realiza tomando 10  $\mu\text{L}$  del stock disuelto en un volumen final de 1,000  $\mu\text{L}$  DMSO.

Compuesto	NZ
PM (g/mol)	301.320
Cantidad (mg)	2.0
Volumen Stock ( $\mu\text{L}$ )	200
Stock ( $\mu\text{M}$ )	33187.26
<b>Dilución 1:30 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	1106.24
<b>Dilución 1:100 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	33.18

1. Partiendo de la dilución 1:30 se realizaron los cálculos necesarios para obtener los primeros 3 puntos de la curva a una concentración 10X, respecto a la concentración deseada del tratamiento (el volumen final del pozo fue de 110  $\mu\text{L}$ ).
2. Con la dilución 1:100 se consideraron los cálculos pertinentes para obtener los últimos 2 puntos de la curva a una concentración 10X respecto a la concentración deseada del tratamiento, el volumen final del pozo es de 110  $\mu\text{L}$ .
3. A continuación se muestra la estrategia que se siguió para el NZ. La administración se realizó a 5 pozos de una microplaca de media área a partir de una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  de los tubos a una concentración 10X. Es necesario observar que el vehículo empleado para la administración de cada tratamiento es la solución TP y ésta última se mantuvo a una temperatura de 25 °C.

Pozo	10X ( $\mu\text{M}$ )	Tratamiento ( $\mu\text{M}$ )
<b>Control</b>	100	10
<b>1</b>	100	10
<b>2</b>	25	2.5
<b>3</b>	5	0.5
<b>4</b>	0.5	0.05
<b>5</b>	0.1	0.01

