



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer

**Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer**

Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental

Zaragoza

**Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto tert-butyl 5-(((1-(4-methoxyphenyl)-2-nitroethyl) thio) carbonothioyl)-2,5 diazabicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxylate (SL-108) en líneas celulares de Cáncer cérvico uterino (CaSki, HeLa, ViBo).**

## TESIS

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

Presenta:

**Brenda Gutiérrez Martínez**

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Sánchez Sánchez



CDMX, ABRIL 2019.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

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

Comunico a usted que la alumna **GUTIÉRREZ MARTÍNEZ BRENDA**, con número de cuenta **312262314**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **09 de abril de 2019** a las **15:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

- PRESIDENTE** Dr. BENNY WEISS STEIDER
- VOCAL** Dr. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
- SECRETARIO** Dr. HUGO LÓPEZ MUÑOZ
- SUPLENTE** Dra. YOLANDA CÓRDOVA GALAVIZ
- SUPLENTE** Dr. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

El título de la tesis que presenta es: **Actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica del compuesto tert-butyl 5-(((1-(4-methoxyphenyl)-2-nitroethyl)thio)carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxylate (SL-108) en líneas celulares de Cáncer cérvico uterino (CaSki, HeLa, ViBo).**

Opción de titulación: Tesis.

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

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad de México, a 12 de marzo de 2019

**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**  
**DIRECTOR**  
**DIRECCIÓN**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

V.O. BO.  
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ  
JEFE DE CARRERA

“Muéstrate a ti mismo ante tu más profundo miedo; después de eso, el miedo ya no tiene poder y eres libre”

- James Douglas Morrison

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”.

- Marie Curie,

“Haz las cosas lo más simple que puedas, pero no te limites a lo simple”.

- Albert Einstein

## Dedicatorias

¶ **mi madre Yasmin**, la mujer más fuerte, por acompañarme todo este trayecto de vida, sobre todo por apoyarme y confiar en mí en cada una de las decisiones y proyectos que elegí durante este tiempo de vida, por sus enseñanzas que me motivaron a cada día ser mejor y sobre todo por demostrarme que en la vida hay que sonreír.

¶ **mis abuelos Bertha y Herón** por ser los pilares más importantes de mi vida, por ese cariño y apoyo incondicional durante toda mi vida, por motivarme constantemente para alcanzar mis metas y por aportarme las bases fundamentales para enfrentarme a esta vida; muchos de mis logros se los debo a ustedes incluyendo la realización de esta tesis. Los amo.

¶ **mis hermanos Yahir y Erick** por demostrarme que el apoyo de hermanos podría superar los momentos de adversidad, por esos desvelos cuando había mucha tarca y por esas risas incontenibles que me motivaban a levantarme día tras día a luchar.

¶ **mis perros Dogui, Roger, Bombo, Camila y Chiquis** por su espera incondicional en casa hasta que yo llegara, por sus desvelos junto a mí, por nunca dejarme sola y sobre todo por alegrarme cada uno de los días de mi vida.

¶ **mis amigas Mariana, Ingy y Janz** por todo este trayecto de amistad que llevamos, por sus charlas y convivencias que me mostraron que la vida es mejor si se vive en compañía de hermanas de corazón. Por apoyarme en momentos difíciles.

¶ **Yair** por todo el apoyo incondicional que me diste durante toda la carrera.

¶ **mi familia** por creer en mí y apostar por mí.

# Agradecimientos

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por abrirme las puertas y permitirme realizar mi más grande sueño desde niña. Ser universitaria.

A **el Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Oriente** por permitirme formar parte de su alumnado y ser una de las etapas más bonitas de mi vida, donde conocí a mis mejores amigas. Gracias a sus profesores por la enseñanza y orientación que necesité para tomar la mejor decisión de mi vida.

A **la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y a la carrera de Biología** por permitirme cursar y aprender el conocimiento necesario para el pleno desarrollo de mi formación como bióloga.

A **mi Director de Tesis, Dr. Luis Sánchez Sánchez** mi más amplio agradecimiento por haber confiado en mí, por su paciencia ante mis fallas, por su tiempo dedicado en mi proyecto y en hacerme entender cada uno de los puntos de mi tesis, por sus aportes, críticas y sugerencias que mejoraron este trabajo, por sus consejos valiosos que me permitieron seguir adelante.

A **Dr. Hugo López Muñoz** por darme sus consejos y observaciones que reforzaron el presente trabajo.

A **M. en C. José Misael Vicente Hernández Vásquez** por sus enseñanzas y consejos pero sobre todo por compartir su conocimiento.

A **Dr. Fernando Flores Guzmán** por su apoyo que fue fundamental para llevar a cabo la parte experimental de esta tesis.

A **Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández** por darme las herramientas necesarias para el trabajo en el laboratorio, por sus observaciones y por su amabilidad prestada.

A **Dr. Benny Weiss Steidter** y a **la Dra. Yolanda Córdoba Galaviz** por colaboración en la revisión del presente trabajo, por sus correcciones que ayudaron en el mejoramiento de dicha tesis, por su atención y amabilidad prestada.

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (L-6, 2do piso) perteneciente a la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer ubicada en el edificio de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM); bajo la dirección del Dr. Luis Sánchez Sánchez.

Así mismo este trabajo fue apoyado por los proyectos:

**PAPIIT:** IN216718, IN220916 y

**CONACyT:** 255881 y 253979

## Lista de abreviaturas

<b>CaCu</b>	Cáncer cérvico uterino
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CSFE</b>	Carboxifluoresceína
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>FIT-C</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>h</b>	Horas
<b>min</b>	Minutos
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SNT</b>	Suero de ternera neonatal

## INDICE

1. Resumen .....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. La célula .....	2
2.2. Ciclo celular.....	2
2.3. Muerte celular.....	4
2.3.1. Apoptosis .....	5
2.3.2. Necrosis.....	9
2.4. Cáncer .....	10
2.4.1. Factores de riesgo.....	12
2.5. Cáncer cérvico uterino .....	12
2.5.1. Factores de riesgo.....	14
2.6. Virus del papiloma humano (VPH).....	16
2.7. Tratamientos .....	18
2.8. Nuevas moléculas de interés biológico.....	22
2.8.1. SL-108 un compuesto derivado del SL-16.....	24
3. Planteamiento del problema.....	27
4. Justificación .....	28
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos.....	30
6.1. Generales.....	30
6.2. Particulares .....	30
7. Metodología.....	31
8. Resultados.....	36
9. Discusión .....	51
10. Conclusiones.....	55
11. Bibliografía.....	56
12. Anexos.....	66

## 1. Resumen

El cáncer es una de las principales causas de incidencia y mortalidad a nivel mundial. El cáncer cérvico uterino es uno de los cánceres que afectan directamente a la población femenina, el cual se encuentra en la cuarta causa de muerte e incidencia a nivel mundial mientras que para México se ubica en la segunda causa de muerte para las mujeres. Los tratamientos actuales contra dicha enfermedad son efectivos en cánceres que se detectan a tiempo, únicos y de fácil acceso, sin embargo, en pacientes metastásicos o en etapa terminal, éstos resultan ser poco selectivos e ineficientes, generando efectos secundarios graves en los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad. Por ello se han buscado compuestos que puedan tener una actividad antiproliferativa con una baja o nula actividad necrótica que pueda minimizar los efectos secundarios. Al respecto se han encontrado moléculas como los ditiocarbamatos,  $\beta$ -nitroestireno y la piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano que por sí solos se han reportado en la literatura como agentes antiproliferativos, por lo cual surgió la idea de combinar estas tres moléculas en un solo compuesto, dando origen al tert-butyl 5-(((1-(4-methoxyphenyl)-2-nitroethyl)thio) carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxylate (SL-108) y dado que es un compuesto nuevo, en este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa, necrótica y apoptótica de éste en las líneas tumorales HeLa, CaSki y ViBo. Los resultados obtenidos muestran que el compuesto SL-108 afecta negativamente el potencial proliferativo de las células tumorales HeLa, CaSki y ViBo de una manera dosis dependiente, con valores de  $IC_{50}$  2.4  $\mu$ g/ml, 2.8  $\mu$ g/m y 1.5  $\mu$ g/ml respectivamente. La nula o baja actividad de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) determinada en los sobrenadantes de los cultivos tratados con el compuesto indican que el compuesto SL-108 presenta una baja o nula actividad necrótica en las células tumorales. De igual manera, la observación de una condensación de la cromatina nuclear, la formación de cuerpos apoptóticos y la positividad a caspasa-3 activa de los cultivos tratados con el compuesto SL-108, sugiere que éste induce a las células tumorales a una muerte apoptótica. En relación con las células no tumorales (linfocitos de sangre periférica humana), las concentraciones de  $IC_{50}$  no afectaron el potencial proliferativo de los linfocitos ni se detectó actividad de LDH en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con este compuesto, sugiriendo que el compuesto SL-108 podría ejercer una acción selectiva, haciendo de este compuesto un digno candidato para ser estudiado como un posible fármaco con potencial terapéutico contra el cáncer.

## 2. Marco teórico

### 2.1. La célula

La célula es la unidad de la vida más pequeña rodeada de una membrana que contiene una solución acuosa concentrada de sustancias químicas y dotadas de la extraordinaria capacidad para efectuar todas las actividades propias de la vida lo que implica llevar a cabo el metabolismo, mantener la homeostasis, crecer y reproducirse (Alberts,2006; Vásquez, 2018).

Todas las células se componen de las mismas sustancias: una gran variedad de iones, moléculas inorgánicas y orgánicas, de las cuales se forman el agua, las sales, los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, que estructuran a la propia célula y participa en los procesos bioquímicos que mantienen su vida (Vásquez, 2018).

La vida de estas células está gobernada por el llamado ciclo celular dentro del cual la célula crece, se desarrolla y se reproducen dando lugar a nuevas células. Estas a su vez, reemplazarán a las previamente existentes, que acabarán envejeciendo y muriendo (Hidalgo, *et al*, 2017)

### 2.2 Ciclo celular

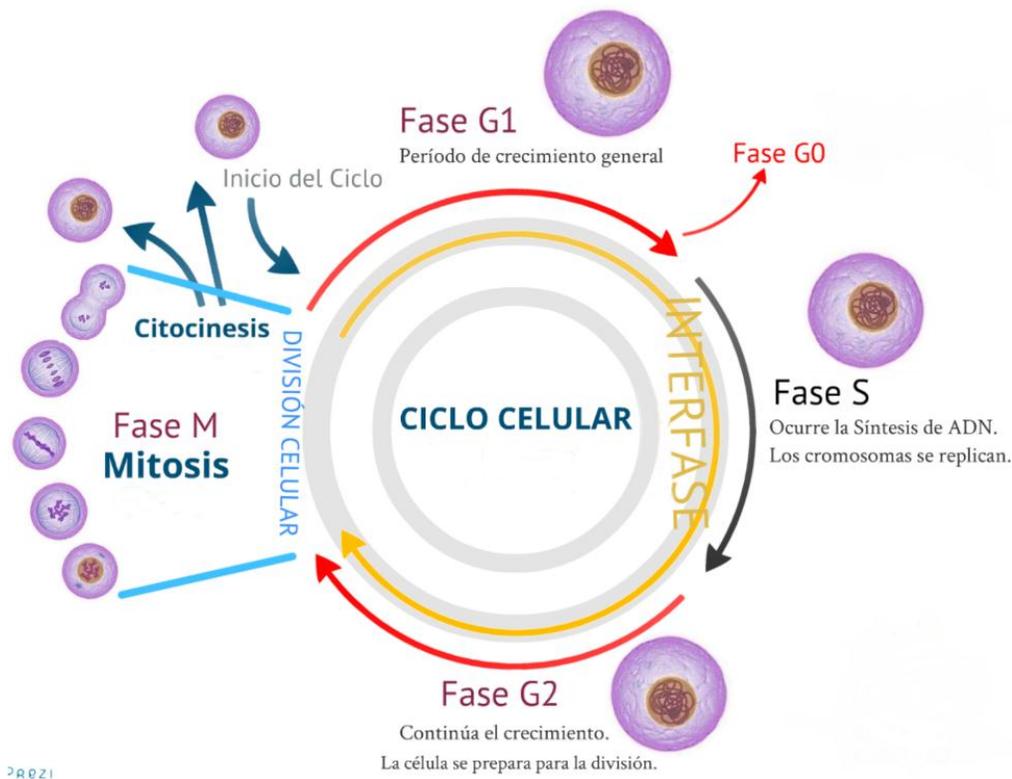
El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula parental (Lodish, *et al*, 2015) mediante la activación y la inactivación cíclicas de proteínas y complejos proteicos que inician o regulan la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis. Las reacciones de fosforilación que controla el ciclo celular son llevadas a cabo por un conjunto específico de proteincinasas, enzimas que transfieren un grupo fosfato de una molécula de ATP a una cadena lateral de aminoácidos de la proteína diana. Los efectos de la fosforilación pueden revertirse con rapidez mediante la eliminación del grupo fosfato, reacción que depende de otro conjunto de enzimas denominadas proteinfosfatasas (Alberts & Bray, 2006).

Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice en forma debida y con la regulación adecuada. Un ciclo celular típico se da en dos fases gigantes que son: la interfase que se divide en tres fases: G1, S y G2 y la mitosis que se divide en profase, prometafase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (Lomanto, 2003).

En la interfase, en G1 es un periodo de actividad bioquímica intensa, la célula crece en tamaño y sintetiza ARN y proteínas requeridas para la síntesis de ADN. Cuando las células han alcanzado el tamaño apropiado y han sintetizado las proteínas requeridas, entran en el ciclo atravesando un punto en G1 que se considera como START (Lodish, *et al*, 2015).

La fase S se caracteriza por la replicación del DNA nuclear. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis debe generarse dos juegos o complementos de ADN

idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. El ADN es una doble hélice que durante la replicación se abre y cada cadena es utilizada como molde para la producción de una nueva doble cadena, que queda unida a la original y que sirve como guía. El proceso clave de la replicación del ADN ocurre durante la fase S (síntesis) del ciclo celular, momento en el cual las histonas (H1, H2a, H2b, H3 y H4) y otras de las proteínas asociadas al ADN son sintetizadas (ADN polimerasas, ligasas, topoisomerasas entre otras) (Lomanto, 2003). A continuación la célula pasa a la fase G2, durante la cual crece otro poco y luego sintetiza las proteínas que necesita para dividirse. (Audersik, *et al*, 2013).



**Figura 1.** Ciclo celular. Se muestra las dos fases que comprenden el ciclo celular: la Interfase (G1, S y G2) y la Fase M. (Tomado y modificado de <http://biologiaroja.blogspot.com/2017/04/ciclo-celular.html>).

Una vez terminada la fase G2, se da comienzo a la fase M (mitótica) que está dividida en varias etapas, comenzando con la profase donde la envoltura nuclear se retrae al interior del retículo endoplasmático y las membranas del Golgi se rompen y se convierten en vesículas que es necesario para la formación del huso mitótico. Un complejo de multiproteínas, el cinetocoro se ensambla en cada centrosoma. Después de la ruptura de la envoltura nuclear, los cinetocoros de las cromátidas hermanas se asocian con los microtúbulos que vienen de los polos opuestos del huso y los cromosomas se reúnen en una placa metafásica en el centro de la célula en la metafase, a continuación en la anafase las cromátidas hermanas se separan una vez completado este proceso, el huso mitótico se desensambla y los cromosomas se descondensan en la telofase. La envoltura

nuclear se vuelve a formar alrededor de los cromosomas segregados y la citocinesis da paso a la división física del citoplasma dando como resultado dos células hijas (Lodish, *et al*, 2015).

Los procesos básicos tales como la replicación del ADN, la mitosis y la citocinesis se ponen en marcha mediante un sistema de control central del ciclo celular. Los puntos de chequeo actúan en lugares cruciales del ciclo celular, es decir, entre el final de una etapa y el inicio de la siguiente; uno de ellos se encuentra en G1, justo antes de entrar en fase S y el otro en G2 antes de la mitosis. En estos puntos de control se examina el estado nutricional, la masa celular, procesos de crecimiento, estado del ADN, estados de las partículas, entre otros elementos necesarios para a un ciclo celular típico normal (Lomanto, 2003).

El sistema de control del ciclo celular está basado en dos familias claves de proteínas. La primera es la familia de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK), las cuales sufren fosforilación sobre sus aminoácidos (serinas y treoninas). La segunda familia son las ciclinas (CDC) (llamadas así debido a que aparecen y desaparecen a lo largo del ciclo), las cuales se unen a las CDK's y controlan sus reacciones de fosforilación. El ensamblaje cíclico entre estos dos compuestos, ciclinas y CDK, su activación y desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular (Lomanto, 2003).

Solo una coordinada maquinaria reguladora, donde interviene un gran número de factores, puede mantener el equilibrio necesario entre los procesos que entraña la proliferación de las poblaciones celulares, definida como el incremento del número de células, resultado del comportamiento del ciclo celular y del equilibrio entre crecimiento, división y muerte celular (Sánchez, 2001).

### **2.3. Muerte celular**

La muerte celular programada desempeña un papel importante durante el desarrollo embrionario, en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos del organismo, y en la eliminación de las células dañadas (Fuchs & Steller, 2011). Así, los episodios que rodean a la muerte celular programada entran a formar parte de los procesos fisiológicos que resultan necesarios para el funcionamiento normal de un organismo (Jordán, 2003). El organismo humano se caracteriza por tener una marcada estabilidad para mantener el medio interno, gran parte de este control es gracias a un amplio sistema de regulación que permite un balance apropiado entre la pérdida, renovación y diferenciación celular (Craig, 1995). Sin embargo, un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno; cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos irreversibles que impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: pérdida de su función, daño mecánico, infección por microorganismos o virus, acción de agentes químicos tóxicos o la falta de nutrientes (Iracheta, 2007).

El Comité de Nomenclatura sobre muerte celular (NCCD) publicó en 2018 una nueva clasificación sobre muerte celular desde una perspectiva morfológica, bioquímica y funcional dentro de las cuales incluyen 13 tipos de muerte celular donde encontraremos a la apoptosis y la necrosis (Galluzzi, *et al* 2018).

### 2.3.1. Apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado a través del cual las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. Dicho fenómeno biológico es fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario (Machado & Concepción, 2012).

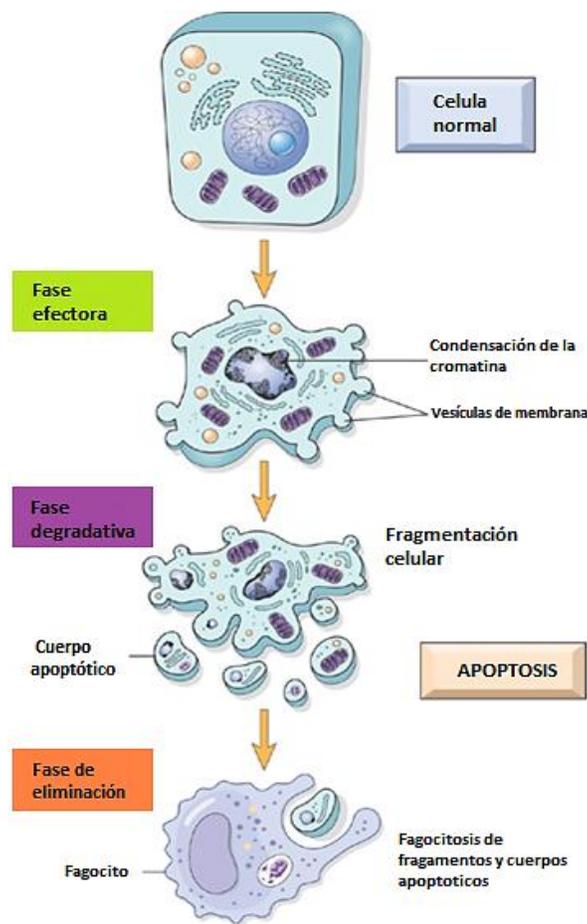
Dicho fenómeno puede estar frenado, en equilibrio o estimulado. Por ejemplo, está en equilibrio respecto de la mitosis en los tejidos adultos sanos. Es muy significativo su rol homeostático en la médula ósea, donde debe destruir de manera constante la mitad de una inmensa cantidad de células que sólo en leucocitos significa  $5 \times 10^{11}$  cada 24 h (Machado & Concepción, 2012). Cuando está ausente o frenado se puede manifestar como cáncer o autoinmunidad, mientras que la muerte acelerada o estimulada se aprecia en enfermedades degenerativas agudas y crónicas, inmunodeficiencias e infertilidad (Danial, 2009).

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una serie de cambios morfológicos que revelan; condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (Prado, 1997), rotura específica de proteínas celulares, la rotura endolítica del ADN en fragmentos oligonucleosómicos (Cascales, 2003), las proteínas del citoesqueleto se desensamblan, la función mitocondrial se reduce (Iracheta, 2007) y finalmente ocurre la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos o incluso por células vecinas (Cascales, 2003) evitando así una respuesta inflamatoria (Figura 2). La liberación de los cuerpos apoptóticos inspiró el término de “apoptosis”, palabra griega que significa “caerse o desprenderse”, que evoca la caída de las hojas de los árboles en otoño (Rojas, Salmen, & Berrueta, 2009).

Estas dramáticas alteraciones celulares, que permiten el empaquetamiento de la célula moribunda y su subsiguiente envoltura por células vecinas o fagocitos, pueden ser atribuidas a las acciones de las caspasas, una familia de proteasas dirigidas por cistein-aspartato que escinden una amplia gama de proteínas celulares. Aunque la escisión de muchos sustratos de caspasa es necesaria para el empaquetamiento estructural de los contenidos celulares durante la apoptosis, un subconjunto de sustratos de caspasa son moléculas de señalización cuya escisión altera sus propiedades de señalización para afectar el entorno interno de la célula moribunda. A su vez, las moléculas de

señalización pueden modular la función de la caspasa para alterar positiva o negativamente la trayectoria del programa de muerte celular (Kurokawa & Kornbluth, 2009).

Este proceso puede constar de tres fases principales dentro de las cuales podemos encontrar: fase efectora, fase degradativa y fase de eliminación, para que estas cascadas de eventos se den se necesita de dos clases de proteasas especializadas: las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras. Las caspasas iniciadoras (8, 9, 10) se activan después de un estímulo apoptótico por auto-proteólisis. Las caspasas efectoras o ejecutoras (3, 6, 7) se activan por las caspasas iniciadoras en una cascada amplificadora. La activación de las caspasas es una etapa crucial para la activación de la apoptosis cualquiera que sea el estímulo (Cascales, 2003).



**Figura 2.** Proceso apoptótico que comprende las siguientes fases: efectora, degradativa y la fase de eliminación con sus distintos cambios morfológicos que se presenta. Tomada y modificada de <http://biologueandomol.blogspot.com/2017/05/que-es-la-apoptosis-la-apoptosis-se.html>.

## **Vías de activación de la apoptosis**

Existen dos vías por las que se puede activar la cascada amplificadora de caspasas, una que es mediada por ligandos que llegan a la célula (extrínseca) y la otra vía es mediada por el estrés celular o la lesión en la membrana mitocondrial (intrínseca).

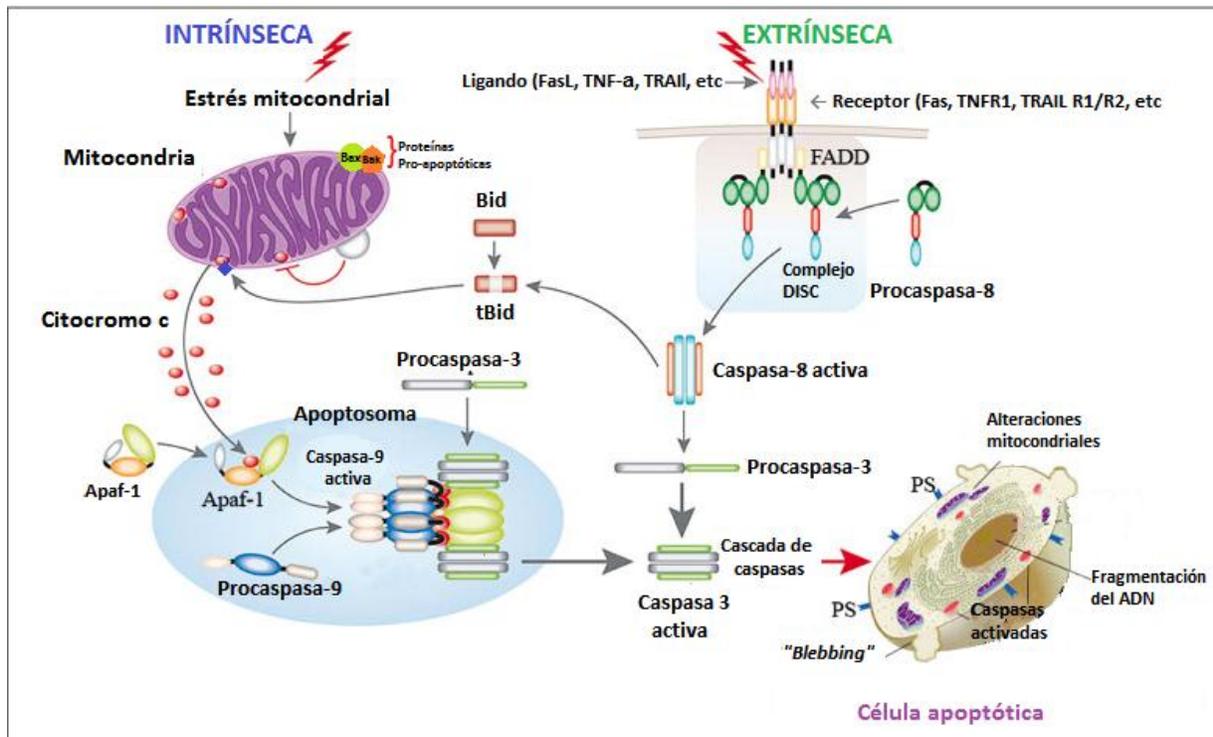
### **Vía Extrínseca: activada por medio de ligandos que llegan a receptores de muerte**

La primera vía por la cual se puede activar un proceso apoptótico es a través de ligandos que llegan a los receptores de muerte que se localizan en la membrana plasmática de la célula y los cuales activan esta cascada de reacciones río abajo para culminar el proceso apoptótico.

Esta vía se activa cuando la célula comienza a recibir señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Machado & Concepción, 2012). Cuyos miembros tienen en común un dominio extracelular rico en cisteína, un dominio transmembrana y una secuencia en su dominio citoplasmático para acoplar el receptor con el resto de la maquinaria apoptótica (Iracheta, 2007) (Figura 3).

La activación de esta vía se da cuando un ligando de muerte (FasL) se une a su receptor específico (Fas) en la superficie celular lo que provoca la formación de un complejo homotrimérico mínimo ligando-receptor, que seguidamente recluta factores citosólicos, tales como FADD y procaspasa 8, 10 o ambas formando el complejo DISC (complejo de señalización inductor de muerte) que conduce a la activación de procaspasas iniciadoras tales como la caspasa 8, la cual posteriormente rompe y activa a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (Rojas, Salmen, & Berrueta 2009; Baeza, 2014) que son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del ADN, entre otras (Torres & Vargas, 2003).

Esta vía puede ser regulada por diferentes factores, entre ellos el inhibidor de las proteínas apoptóticas (IAP) que afecta a las caspasas iniciadoras y a las ejecutoras (Cascales, 2003).



**Figura 3.** Vías de activación del proceso apoptótico. La vía extrínseca es activada a través de la llegada de un ligando a un receptor de muerte mientras que la vía intrínseca se activa mediante estímulos internos como el estrés mitocondrial. (Tomada y modificada de Calvino & Parra, 2010).

### Vía intrínseca o mitocondrial

Este tipo de vía se activa cuando la célula recibe desde el interior una señal en respuesta a una lesión u otras formas de estrés, como el daño en el ADN, falta de oxígeno, de nutrientes o de señales de supervivencia (Baeza, 2014), daño en el citoesqueleto, estrés del retículo endoplasmático, pérdida de adherencia e inhibición de la síntesis macromolecular y otros (Chipuk, Bouchier & Green, 2006). En este proceso están involucradas proteínas de la familia de Bcl-2 que pueden actuar inhibiendo (proteínas antiapoptóticas: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-2w, etc) o favoreciendo (proteínas pro-apoptóticas: Bax, Bcl-XS, Bak, etc) la apoptosis (Kroemer, 1999). Al activarse las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bak de esta familia se producirá un poro en la membrana externa de la mitocondria lo que permitirá la liberación de numerosas proteínas al citosol como el citocromo c (Machado & Concepción, 2012) una vez ahí se une a Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1) que en presencia de ATP se forma el complejo proteico llamado "Apoptosoma", el cual recluta y activa a la procaspasa 9 mediante proteólisis auto catalítica, la cual una vez activada puede activar a las caspasa 3, 6 y 7 para terminar con el proceso apoptótico (Torres & Vargas, 2003) (Figura 3). Por otro lado, a la salida de citocromo c desde la mitocondria, otra proteína llamada SMAC/DIABLO la cual es inhibidor de los inhibidores de caspasas (IAPS) sale de la misma. Así se tiene una vía en la

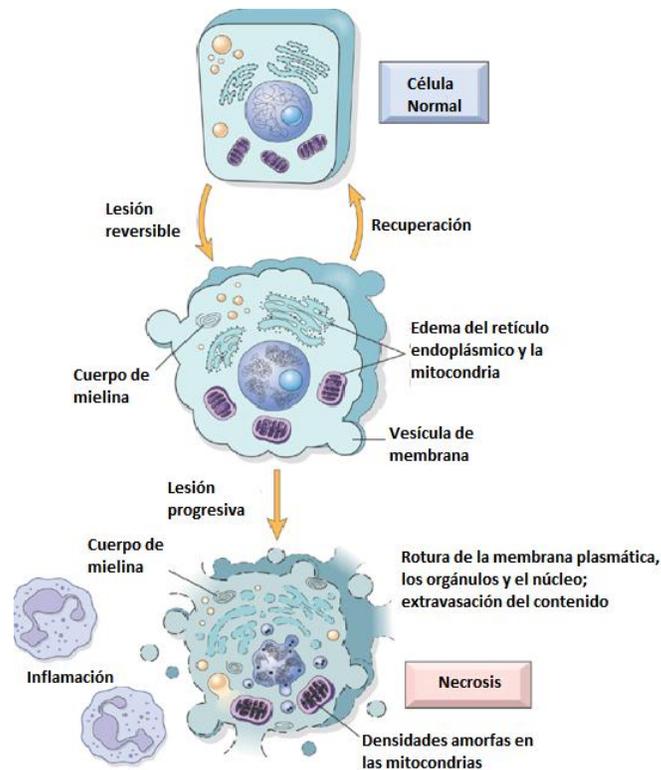
que la caspasa efectora está libre de actuar (dado que sus inhibidores fueron evitados por SMAC/DIABLO) y la apoptosis continúa de forma natural (Rotstein, *et al*, 2003).

## **Necrosis**

La necrosis es una forma de muerte celular calificada como violenta, que se origina debido a una lesión aguda e irreversible que es derivada de una situación no fisiológica o patológica que no puede ser reparada por el mecanismo de adaptación y de resistencia de la célula. Ésta puede ser causada debido a agentes nocivos, condiciones o circunstancias determinadas como por ejemplo: un aporte insuficiente de sangre al tejido (isquemia), falta de oxígeno (hipoxia), un traumatismo, la exposición a la radiación ionizante, la acción de sustancias química o tóxicos (Iracheta, 2007).

Las células que mueren por necrosis presentan características morfológicas y bioquímicas distintivas: los cambios tempranos incluyen aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al microambiente, lo que desencadena un proceso inflamatorio que daña a las células vecinas (Torres & Vargas, 2003). Dicha degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de ATP. El proceso inflamatorio conduce a las células vecinas también hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (Jordán, 2003).

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima detectable en el citoplasma de casi todas las células del ser humano, que se convierte extracelular después de la muerte celular, por lo tanto su presencia extracelular está siempre relacionada con la necrosis celular y lesión tisular (Puentes, 2016).



**Figura 4.** Muerte celular por necrosis, los cambios morfológicos característicos de este tipo de muerte incluyen la rotura de la membrana plasmática y la liberación del contenido celular al medio lo que provocará un proceso inflamatorio. (Tomada y modificada de [fisiopatologiahumana.wordpress.com/2015/10/30/muerte-celular-necrosis-y-apoptosis/](http://fisiopatologiahumana.wordpress.com/2015/10/30/muerte-celular-necrosis-y-apoptosis/)).

## 2.4. Cáncer

El cáncer es una proliferación celular descontrolada causada por factores físicos, químicos, genéticos o biológicos (Quezada, 2007). Que permite la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas que posibilitan a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y del ciclo celular (Willingham, *et al*, 2004).

Un cáncer es resultado de dos procesos sucesivos: el aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia junto con la adquisición por estas células de la capacidad invasiva que le permite escapar de su sitio natural y colonizar nuevos tejidos u órganos en un proceso conocido como metástasis (Muñoz, 2004). Estas características son usadas para definir un cáncer.

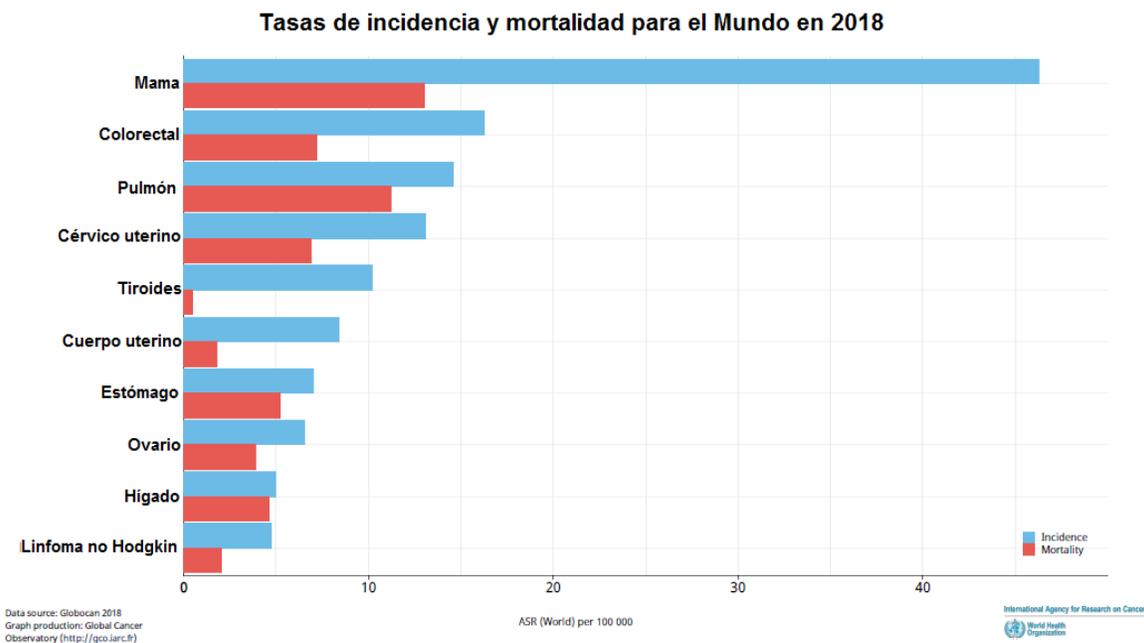
Por lo que si un tumor solo tiene lugar donde normalmente se halla, se habla de un tumor benigno (Muñoz, 2004) pero si por el contrario el tumor es capaz de invadir el tejido normal adyacente y

propagarse por el cuerpo a través del torrente sanguíneo o linfático se le conoce como tumor maligno o cáncer (Cooper & Hausman, 2009).

Los tumores se clasifican generalmente según el origen de las células de donde surgen y se agrupan en: 1) carcinomas, aquellos cuyo origen son células epiteliales; 2) sarcomas, cuyo origen son las células del tejido conectivo, como el músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso; y 3) aquellos que no se ajustan a ninguna de las categorías anteriores y se incluyen las leucemias, y los tumores del sistema nervioso (Cooper & Hausman; 2009).

El grado de malignidad del cáncer es variable, básicamente depende de la agresividad de sus células y características biológicas. Son capaces de diseminarse y provocar metástasis (anidarse) en órganos y tejidos distantes. Su velocidad de crecimiento va más allá de los límites normales y, sus vías de diseminación pueden ser a través del sistema linfático (diseminación linfática) o del circulatorio (diseminación hemática) o, por extensión e invasión directa a los tejidos vecinos (De la Garza & Juárez, 2014).

Según la OMS el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. Actualmente se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer dependiendo del tejido del que se deriven. Los cánceres más frecuentes a nivel mundial se muestran en la figura 5.



**Figura 5.** Tasas de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer a nivel mundial. (Tomada y modificada de <https://gco.iarc.fr/>).

### 2.4.1. Factores de riesgo

- **Factores físicos**

Dentro de los agentes físicos que pueden causar cáncer se encuentran las radiaciones ionizantes (rayos X), las radiaciones no ionizantes (rayos ultravioleta del sol) y las radiaciones que emite la propia corteza terrestre (radón) (AECC, 2018). El poder mutagénico de las radiaciones se debe al potencial mutagénico que tienen al incidir sobre la molécula de ADN, a la que alteran de distintos modos, causando roturas en las cadenas de nucleótidos o induciendo la formación de enlaces covalentes estables entre las bases de la misma o de distinta cadena, lo que genera a su vez errores durante la replicación o expresión del ADN, mientras que para las radiaciones de radón es probable que su mecanismo de acción se debe a que puede provocar deleciones o pérdidas de fragmentos en el ADN, y de translocaciones cromosómicas (Muñoz, 2004).

- **Factores Químicos**

Existen una larga lista de agentes químicos, muchos de ellos generados por la actividad industrial humana que pueden inducir un cáncer por medio de su mecanismo de acción que implica la unión covalente con el ADN, dañando su estructura y provocando mutaciones. El tipo de mutación que causan varía de un compuesto a otro. Dentro de estos compuestos se encuentran las nitrosaminas, arsénico, plomo, níquel, mercurio, cadmio, benceno, hidrocarburos clorados, entre otros (Muñoz, 2004).

- **Factores Biológicos**

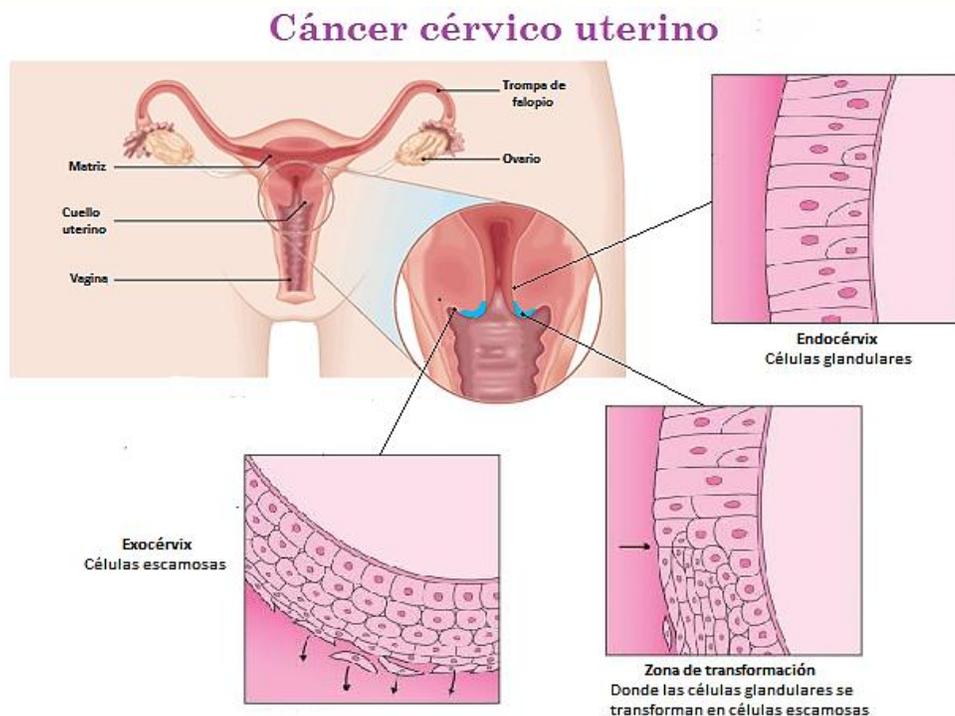
Los agentes biológicos que pueden favorecer a la aparición del cáncer han tomado gran relevancia ya que el 18% de los cánceres son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, entre los que destacan el virus del papiloma humano (cáncer de cuello uterino), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado) y el *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago) (AECC, 2018). Los virus afectan debido a que presentan en su propio genoma versiones mutadas de protooncogenes celulares que afectan a la maquinaria celular, esto se debe a que cuando los virus expresan sus genes también expresan estos oncogenes que causan el desarrollo de tumores en el organismo infectado (Muñoz, 2004).

## 2.5. Cáncer cérvico uterino

El cáncer de cuello uterino o cáncer cervical se origina en las células que revisten el cuello uterino, la parte inferior del útero (matriz). Algunas veces se le llama cérvix uterino. El feto crece en el cuerpo del útero (la parte superior). El cuello uterino conecta el cuerpo del útero con la vagina (el canal por

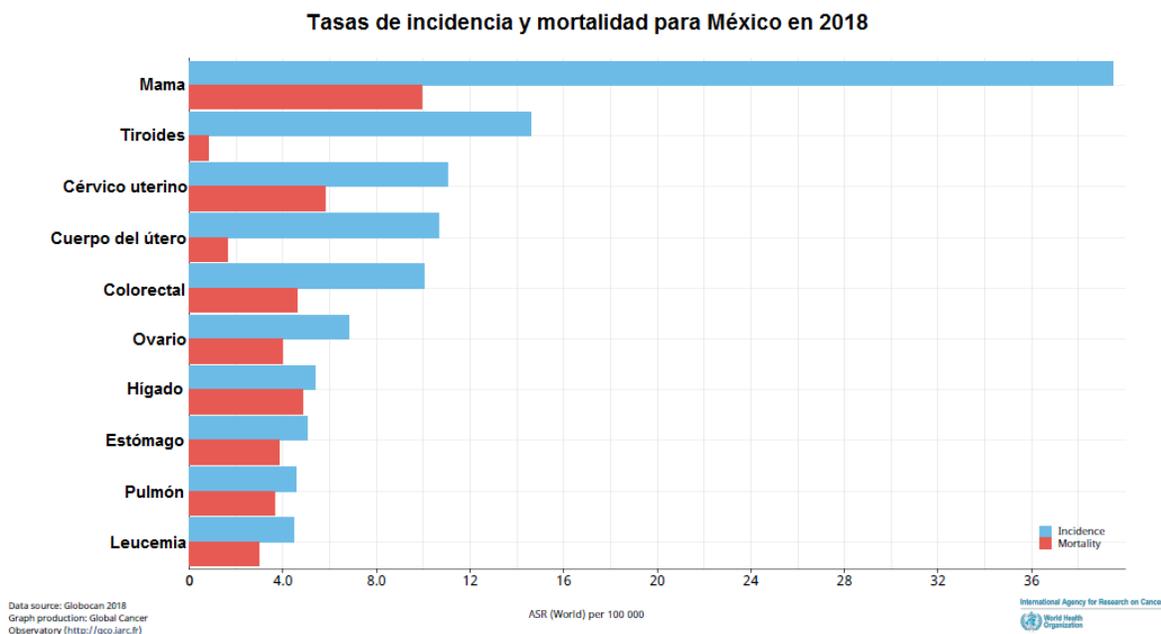
donde nace el bebé). La parte del cuello uterino más cercana al cuerpo del útero se llama endocérnix y está cubierto por células glandulares mientras que en la parte próxima a la vagina es el exocérnix y está cubierto por células escamosas. Estos dos tipos de células se encuentran en un lugar llamado zona de transformación. La ubicación exacta de la zona de transformación cambia a medida que envejece y si da a luz. La mayoría de los cánceres de cuello uterino se originan en las células de la zona de transformación (Figura 6). Estas células no se tornan en cáncer de repente, sino que las células normales del cuello uterino primero se transforman gradualmente con cambios precancerosos, los cuales se convierten en cáncer (ACS, 2018).

Existen dos tipos de cáncer cérvico uterino; los carcinomas de células escamosas que se originan con mayor frecuencia en la zona de transformación (donde el exocérnix se une al endocérnix) y el cual es responsable de 9 de cada 10 casos de los cánceres de cuello uterino mientras que los adenocarcinomas se originan de células glandulares productoras de mucosidad del endocérnix. Y con menor frecuencia se presentan los carcinomas adenoescamosos o carcinomas mixtos que tienen características tanto de carcinomas de células escamosas como de los adenocarcinomas (ACS, 2018).



**Figura 6.** Células que revisten el cuello uterino. La zona intermedia entre el exocérnix y el endocérnix es la llamada zona de transformación en la cual se desarrollan la mayoría de los cánceres cérvico uterinos. (Tomadas y modificadas de <https://www.bupa.co.uk/health-information/cancer/cervical-cancer>, <https://www.jostrust.org.uk/about-cervical-cancer/cervical-screening-smear-test-and-abnormal-cells/abnormal-cervical-screening-results>).

El cáncer de cuello uterino ocupa el cuarto lugar de incidencia y mortalidad a nivel mundial, con un estimado de 569,847 nuevos casos en el 2018, mientras que para México se ubica en el tercer lugar de incidencia con un estimado de 7 869 casos y el segundo lugar en mortalidad con 4 121 muertes en el año 2018 (GLOBOCAN, 2018) convirtiéndose en un problema de salud para la población femenina (Figura 7).



**Figura 7.** Tasa de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en México, se aprecia que el cáncer cérvico uterino se ubica en el tercer lugar de incidencia y el segundo lugar en mortalidad para México (Tomado y modificado de <https://gco.iarc.fr/>).

Pueden existir diferentes factores de riesgo por los cuales se puede desarrollar el cáncer cérvico uterino.

### 2.5.1. Factores de riesgo

#### ➤ Multiparidad

Se señala que el cáncer cérvico uterino es más frecuente en las mujeres con hijos que en las que no han tenido hijos, lo cual se asocia a los cambios histológicos que pueden producirse en el epitelio escamoso columnar, donde se provocan desgarros o erosiones, que pueden crear daños en la multiplicación celular de dicha membrana. Una vez que se ocasiona estas lesiones traumáticas, el tejido necesita una regeneración, y si ésta ocurre, cubrirá todo la zona del desgarrado con un epitelio cilíndrico, que luego será cubierto con el pavimentoso y si logra mantener en su posición anterior la estructura anatómica del cuello, no habrá alteraciones. También se le atribuye a que el tiempo entre

un parto y otro, es corto, por lo que los órganos reproductores femeninos no se restablecen completamente (Dunan, *et al*, 2011).

➤ **Mala alimentación**

Las mujeres con una alimentación que no incluya suficientes frutas, ensaladas y verduras pueden tener un mayor riesgo de cáncer de cuello uterino.

➤ **Tabaquismo**

Existe una relación directa entre el riesgo de lesiones preinvasoras y la duración e intensidad del hábito. En promedio se considera que las fumadoras tienen doble riesgo de lesión intraepitelial con respecto de las no fumadoras. Experimentalmente se ha demostrado la presencia de nicotina, cotinina y otros mutágenos derivados del tabaco, en mujeres fumadoras con lesión intraepitelial (Serrano, *et al*, 2004). Por lo que se cree que estas sustancias dañan el ADN de las células en el cuello uterino y pueden contribuir al origen del cáncer de cuello uterino. Además, fumar hace que el sistema inmunitario sea menos eficaz en combatir las infecciones con VPH (ACS, 2018).

➤ **Infección por virus de papiloma humano**

Uno de los factores de riesgo más importantes en la etiología del cáncer cérvico uterino es la infección con el virus del papiloma humano (VPH) un virus de ADN tumoral transmitido por vía sexual, del cual existen tipos específicos que son responsables de casi todos (99,8%) los casos de cáncer de cuello uterino (Saavedra & Soberón, 2006).

➤ **Múltiples parejas sexuales**

Existe una relación importante entre el número de parejas sexuales y el riesgo de lesiones intraepiteliales ya que esto hace una exposición más prolongada a una infección con VPH.

➤ **El uso prolongado de anticonceptivos orales**

La investigación sugiere que el riesgo de cáncer de cuello uterino aumenta mientras más tiempo una mujer tome las píldoras, pero el riesgo se reduce nuevamente después de suspender las píldoras, y regresa a lo normal aproximadamente 10 años después de suspenderlas (ACS, 2018). El riesgo se asocia con las hormonas esteroidales que se recetan como anticonceptivos ya que éstas favorecen a la expresión de dos genes virales E6 y E7 que son necesarios para las actividades oncogénicas de los VPH de alto riesgo, además de que interfieren con las funciones de los genes celulares

implicados en la regulación del ciclo celular y la muerte celular programada. (Von Knebel, Spitkovsky & Ridder, 1997).

➤ **Inicio a temprana edad de relaciones sexuales**

Se ha demostrado que el inicio de las relaciones sexuales a los 19 años o menos incrementa 4 veces el riesgo de padecer cáncer cérvico uterino (Buenrostro, 2011). Esto se debe a la inmadurez que tienen las células del cuello uterino en los adolescentes (19 años o menos) lo que los hace más susceptibles a la acción de los carcinógenos y a una posible infección con el papilovirus humano durante el acto sexual. Si se infectan más fácilmente con este virus existe una mayor posibilidad de que se genere un cáncer cérvico uterino (Baltazar, *et al*, 2008).

➤ **Enfermedades de transmisión sexual**

Se ha demostrado una asociación entre el cáncer cérvico uterino y algunas enfermedades de transmisión sexual tales como la infección con *Chlamydia trachomatis*, el virus del herpes simple tipo 2 y el virus de la inmunodeficiencia humana VIH (Bosch & De Sanjosé, 2003). La infección por *Chlamydia trachomatis* se ha demostrado que es un factor de riesgo tanto para la infección primaria como para la infección persistente por VPH (Frontela, *et al*, 2014). Mientras que la infección por el VIH, el virus que causa el SIDA, provoca daño al sistema inmunitario de las mujeres y ocasiona que estén en un mayor riesgo de infecciones por VPH. El sistema inmunitario es importante para destruir las células cancerosas, así como para retardar su crecimiento y extensión (ASC, 2018).

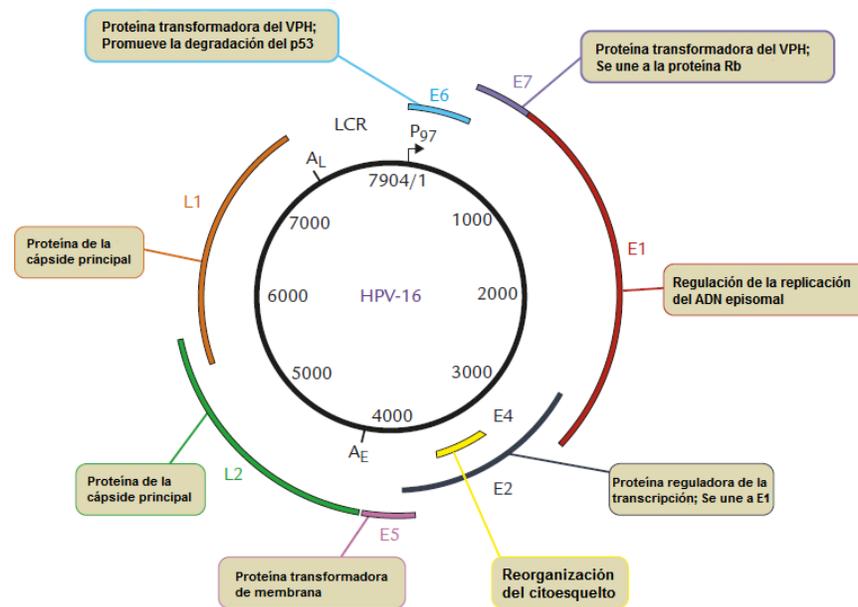
## **2.6. Virus del papiloma humano (VPH)**

Los VPH comprenden un grupo de virus no envueltos, de ADN pequeño, con simetría icosaédrica, que inducen verrugas o papilomas en una gran variedad de vertebrados superiores, incluyendo al hombre. Cada tipo es asociado preferentemente con una lesión clínica específica y con un sitio anatómico preferencial por cada epitelio escamoso, mucosa o cutáneo (Cruz & Diego, 2005).

Debido a que existen muchos tipos del virus del papiloma humano se ha llegado a clasificar en dos grupos que se denominan de “alto riesgo” entre los que se encuentran 15 tipos (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82), de “bajo riesgo” 12 tipos (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108) y como probablemente carcinogénicos 3 tipos (VPH 23, 53, y 66) (Muñoz, *et al*, 2003). Se ha encontrado que el VPH 16 y VPH 18 por su potencial oncogénico se relacionan con el desarrollo de cáncer cérvico uterino y que causan aproximadamente el 70% de todos los casos del cáncer cérvico uterino. Estos virus se han vinculado a diferentes alteraciones moleculares con la carcinogénesis cervical como: alteraciones en el receptor del factor del crecimiento epidérmico

(RFCE), la sobreexpresión del HER-2-neu, la mutación del H-ras y K-ras y la amplificación/sobreexpresión del c-myc (Hernández, *et al*, 2005).

El genoma del VPH está conformado por dos tipos de genes, los que son codificados en las etapas tempranas conocidos como genes E (E1, E2, E4, E6 y E7) y aquellos que se codifican de manera tardía conocidos como L (L1 y L2). Los genes E están implicados en la potencia carcinogénica del virus ya que codifica proteínas involucradas en la replicación y en la regulación viral, mientras que los genes L codifican para proteínas de la cápside viral (Sanabria, 2009) (Figura 8).



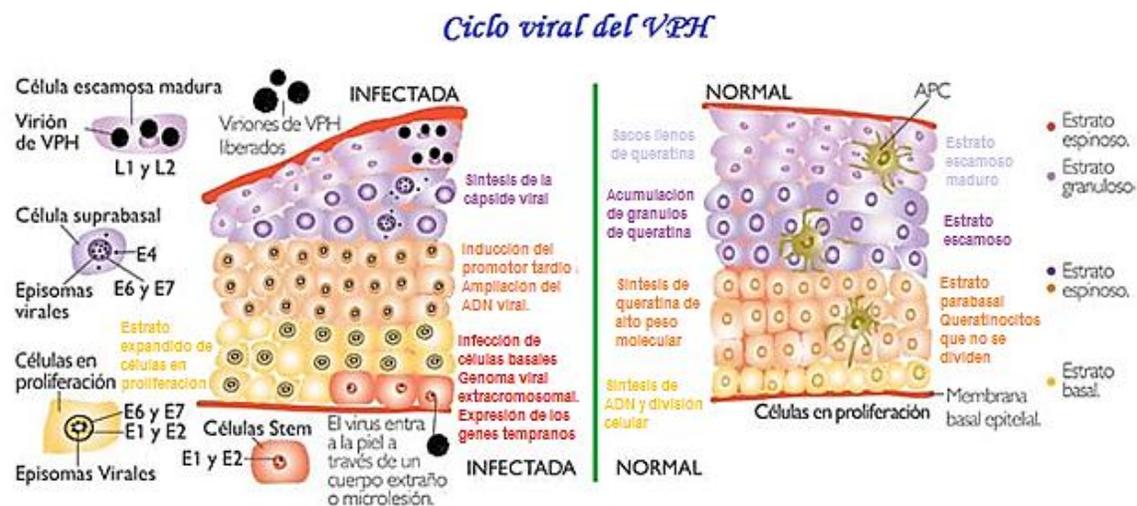
**Figura 8.** Genoma del VPH 16. (Tomado y modificado de Lin, *et al*, 2010)

Sin embargo, la mayoría de las infecciones por el VPH son desinteresadas y transitorias pero en las infecciones persistentes, la expresión del genoma del VPH está correlacionada con la maduración de la célula infectada (Lin, *et al*, 2010).

El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas con bajo número de copias de las capas basales del epitelio a través de lesiones, micro heridas y abrasiones del tejido mediante la unión al receptor de membrana, la molécula  $\alpha 6$ -Integrina, donde inicia la transcripción de sus genes (Sanabria, 2009) (Figura 9). Tiempo después de la infección hay una ronda de replicación del ADN viral que parece ser independiente del ciclo celular y que amplifica el número de copias virales a aproximadamente 50-100 copias/célula. La expresión de los genes virales es mínima, en particular la expresión de los oncogenes E6 y E7 es muy estricta, con transcripciones E6/E7 apenas detectables (Stanley, Pett, & Coleman, 2007). La disrupción de E2 libera los promotores virales de las oncoproteínas E6 y E7 e incrementa la expresión de estos genes transformantes (Cruz & Diego, 2005). Cuando el queratinocito infectado entra en la fase de diferenciación hay un aumento masivo de la regulación de la expresión génica viral, se produce

replicación del ADN viral, hay amplificación del número de copias virales a al menos 1000 copias/célula, abundante expresión de los genes tempranos E6 y E7 y expresión de los genes tardíos del promotor tardío (Stanley, Pett, & Coleman, 2007).

La proteína E4 se une a las citoqueratinas y participa en la modificación de la red del citoesqueleto; E5 afecta a los receptores celulares de los factores de crecimiento (Di Bonito, *et al*, 2006) mientras que la proteína temprana E6 se une e inactiva el producto de un gen supresor de tumor p53 mediante su degradación por la vía de la ubiquitina, mientras que la proteína E7 se une y reprime a la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (Rb); lo que permitirá que exista un fallo en el proceso de proliferación y apoptosis (Saavedra & Soberón, 2006). De esta manera E6 y E7 cooperan eficientemente en la transformación de las células, produciendo tumores cervicales a largo plazo (Hernández, *et al*, 2005).



**Figura 9.** Ciclo viral del VPH en el epitelio estratificado y el tejido normal del cuello uterino. (Tomado y modificado de Saavedra & Soberón, 2006).

## 2.7. Tratamientos

Los tratamientos usados en pacientes diagnosticadas con cáncer cérvico uterino dependerán de un factor importante que es la etapa (estadio) en que se encuentra el cáncer cervical incluyendo también otros factores como la localización exacta del cáncer en el cuello uterino, el tipo de cáncer (de células escamosas o adenocarcinoma), su edad, su estado de salud general, y si desea tener hijos (ACS, 2018).

## Cirugía

La cirugía (extirpación del cáncer en una operación) se utiliza a veces para tratar el cáncer de cuello uterino

- Criocirugía: Una sonda de metal muy fría se coloca directamente en el cuello uterino. Esto destruye las células anormales mediante congelación (ACS, 2018).
- Cirugía con láser: Procedimiento quirúrgico en el que se usa un rayo láser (un haz de luz fino e intenso) como un bisturí para cortar tejidos o extirpar lesiones superficiales como las de un tumor sin causar sangrado (NIH, 2018).
- Conización: Se extrae del cuello uterino un pedazo de tejido en forma de cono. Este procedimiento se hace utilizando un bisturí quirúrgico o bisturí láser (biopsia de cono con bisturí frío) o utilizando un alambre delgado calentado mediante electricidad (procedimiento electroquirúrgico). Después del procedimiento, se examina el tejido extirpado con un microscopio. Si los márgenes (bordes más externos) del tejido contienen cáncer (o precáncer), lo que se conoce como márgenes positivos, es posible que algo de cáncer (o precáncer) haya quedado de modo que se necesita tratamiento adicional (ACS, 2018).
- Histerectomía simple: Esta cirugía se hace para extirpar el útero (tanto el cuerpo del útero como el cuello uterino), pero no las estructuras próximas al útero (parametrio y ligamentos uterosacros) (ACS, 2018). Existen diferentes maneras de realizar una histerectomía dependiendo la zona por donde sea extirpado el útero: Histerectomía abdominal, histerectomía vaginal, histerectomía laparoscópica e histerectomía vaginal asistida por laparoscopia (NIH, 2018; ACS, 2018).
- Cervicectomía: Permite a las mujeres ser tratadas sin perder la capacidad de tener hijos. La operación se realiza a través de la vagina o el abdomen, y a veces se hace mediante laparoscopia (cirugía mínimamente invasiva). En este procedimiento se extirpa el cuello uterino y la parte superior de la vagina, pero no el cuerpo del útero. El cirujano coloca una sutura en “bolsa de tabaco” para que funcione como abertura artificial del cuello uterino dentro de la cavidad uterina (ACS, 2018).

## Radioterapia

La radioterapia es el uso de rayos de alta energía (radiación ionizante) para dañar las células cancerosas como sea posible sin dañar el tejido sano. Para algunos, la radiación se administra antes, durante o después de otros tratamientos (CSC, 2014).

- Radioterapia externa: Se usa una máquina fuera del cuerpo que envía rayos hacia el cáncer. Ciertas formas de administrar la radioterapia pueden ayudar a que la radiación no cause

daño al tejido sano cercano. El tratamiento es muy similar a cuando se hace una radiografía regular, pero la dosis de radiación es más intensa. Se administran 5 días a la semana por un curso total de 6 a 7 semanas (CSC, 2014: NIH, 2018).

- La radioterapia interna consiste en la colocación de una fuente de radiación dentro del cuerpo. Las semillas, cintas o cápsulas se colocan dentro o cerca de las células cancerosas para administrar una dosis de radiación directamente al sitio del tumor. La radiación interna también se puede administrar en forma líquida, la cual se ingiere por vía oral o se inyecta a través de una vena. Dependiendo del tipo de radioterapia interna, algunas personas pueden necesitar permanecer en el hospital hasta que su cuerpo ya no emita radiación a un nivel alto (CSC, 2014).

### **Quimioterapia**

La quimioterapia es un tratamiento contra el cáncer que utiliza medicamentos para interrumpir el crecimiento de células cancerosas, mediante su destrucción o evitando su multiplicación. La quimioterapia se puede administrar de dos maneras:

- ❖ Quimioterapia sistémica: Cuando la quimioterapia se administra oralmente o se inyecta en una vena o músculo, los medicamentos ingresan al torrente sanguíneo y afectan las células cancerosas en todo el cuerpo (NIH, 2018). Debido a que la quimioterapia es un tratamiento sistémico, los efectos secundarios asociados con la quimioterapia a menudo resultan del daño de las células sanas, incluso en áreas que no son sitios de su cáncer (CSC, 2014).
- ❖ Quimioterapia regional: Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el líquido cefalorraquídeo, un órgano o una cavidad corporal como el abdomen, los medicamentos afectan principalmente las células cancerosas en esas áreas (NIH, 2018).

La forma en que se administra la quimioterapia depende del tipo y el estadio del cáncer que está siendo tratado (NIH, 2018). A menudo, la quimioterapia se administra en ciclos, de manera que cada período de tratamiento va seguido de un período de recuperación (ACS, 2018).

### **Inmunoterapia**

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento del cáncer que ayuda al sistema inmunitario a combatir el cáncer. Es un tipo de terapia biológica que usa sustancias producidas por organismos vivos para tratar el cáncer que restaura o estimula el propio sistema inmunológico del cuerpo para detener o retardar el crecimiento de las células cancerosas y evitar que el cáncer se propague. La bioterapia se administra de la misma manera que la quimioterapia: por vía oral, a través de una vena o como inyección. La bioterapia se puede administrar en combinación con quimioterapia (NIH, 2018: CSC, 2014).

Los tipos de inmunoterapia que se usan actualmente contra el cáncer son:

- Los inhibidores de punto de control: Son medicamentos que impiden la acción de ciertas proteínas elaboradas por determinados tipos de células del sistema inmunitario, como las células T, y por algunas células cancerosas. Estas proteínas ayudan a controlar las reacciones inmunitarias y pueden evitar que las células T destruyan células cancerosas. Cuando se impide la acción de estas proteínas, se liberan "los frenos" del sistema inmunitario y las células T pueden eliminar, de mejor forma, las células cancerosas. (NIH, 2018).
- Anticuerpos monoclonales: Se usan anticuerpos producidos en el laboratorio a partir de un tipo simple de células del sistema inmunitario. Los anticuerpos se unen a las sustancias y eliminan las células cancerosas, impiden su crecimiento o diseminación (NIH, 2018).

### **Medicina de precisión y Terapia dirigida**

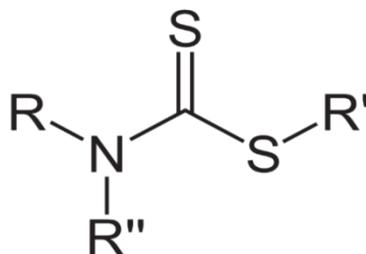
La medicina de precisión usa la información sobre genes, proteínas y otras características del cáncer de una persona a fin de determinar el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad. La terapia dirigida es la base de la medicina de precisión. Se trata de un tipo de tratamiento del cáncer que actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas. La mayoría de las terapias dirigidas utilizan medicamentos micromoleculares o anticuerpos monoclonales (NIH, 2018).

Las generaciones anteriores de fármacos para el tratamiento del cáncer se descubrieron en gran parte a partir de un número limitado de entidades químicas y estos fármacos generalmente se dirigen a la maquinaria celular general relacionada con la proliferación celular. Tales terapias son tóxicas no sólo para las células cancerosas sino también para las células normales de rápido crecimiento (She & Hao, 2013). Por lo que en los últimos años se ha buscado con gran interés nuevas moléculas o compuestos a los que se les pueda evaluar más a fondo su eficacia y su toxicidad contra el cáncer que puedan aminorar los efectos secundarios de dichas terapias.

## 2.8. Nuevas moléculas con interés biológico

### Ditioarbamatos

Los ditioarbamatos son una clase común de moléculas orgánicas que muestran una amplia gama de actividades biológicas como las antibacterianas, anti fúngicas y anticancerígenas (Kamal, 2015), agente anti-VIH (He, *et al*, 2013), inhibidor de la agregación plaquetaria (Rossi, *et al*, 2006), antiinflamatorio (El Sayed, *et al*, 2012), antihistamínico (Karali, *et al*, 1999), antioxidante (Shi, *et al*, 2000), agentes anticolistereasa (Altintop, *et al*, 2013), entre otros. Se ha encontrado en la literatura diferentes compuestos que son ditioarbamatos que han tenido una importante actividad biológica, como la latonina (brassinin) (Zheng, *et al*, 2013; Gaspari, *et al*, 2006) un ditioarbamato de base indolora aislado de verduras crucíferas como el repollo chino, se encontró que era un agente quimiopreventivo significativo (Gaspari. *et al*, 2006). De manera similar, el sulforamato es otro potente inductor de enzimas de fase II que podría ser usado como un agente quimiopreventivo del cáncer (Gerhäuser, *et al*, 1997). Sin embargo, la relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés) de la latonina reveló que la naturaleza quimiopreventiva se debía al motivo del ditioarbamato (Figura 10) y no al anillo indoloro (Gaspari. *et al*, 2006).

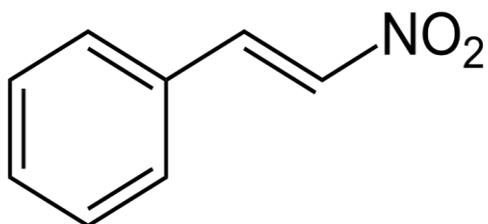


**Figura 10.** Ditioarbamato. (Tomado y modificado de Laskar, *et al*, 2018).

### $\beta$ -Nitroestireno

Por otra parte, se ha encontrado en la literatura que los compuestos de la familia del  $\beta$ -Nitroestireno (Figura 11) que se consideran inicialmente como inhibidores de unión lenta de la proteína tirosina fosfatasa (Billard & Peets, 1974) más tarde se descubrió que tienen una actividad citotóxica, antifúngica (Miranda, *et al*, 2014), antiplaquetarias, anticancerígenas (Chen, *et al*, 2015), inhibe el crecimiento de células tumorales e induce apoptosis (Hung, *et al*, 2016). Por ejemplo, se informó que  $\beta$ -nitroestireno suprimió la proliferación de células cancerosas estomacales y las respuestas inmunológicas de los macrófagos (Carter, *et al*, 2002). Además, un estudio reciente también

demonstró que el 3,4-metilendioxi- $\beta$ -nitroestireno, a través de la inhibición de  $\beta$  integrina y la proteína de superficie disulfuro isomerasa, inhibió la adhesión y la migración en las células del cáncer de mama (Chen, *et al*, 2015). También se ha reportado que el compuesto 2-aryl-3-nitro-2H-cromeno, otro derivado del  $\beta$ -nitroestireno, indujo apoptosis en las células de cáncer de mama por inducción de daño en el ADN y caspasa-3 (Rahmani, *et al*, 2014).

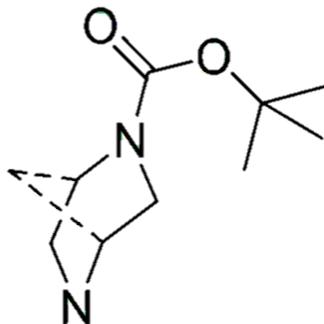


**Figura 11.** Estructura química de  $\beta$ -Nitroestireno. (Tomado de [http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/-Nitrostyrene,MDA\\_CHEM-818165?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F](http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/-Nitrostyrene,MDA_CHEM-818165?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F)).

### **Piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano**

Los heterociclos, caracterizados por la presencia de uno o más anillos con al menos un átomo distinto del carbono, representan una clase de importancia biológica y farmacológica (Dua, *et al*, 2011). En este caso la piperazina (Figura 12), un nitrógeno con seis miembros que contiene heterocíclicos, tiene una importancia significativa en química médica ya que proporciona compuestos con un amplio espectro de actividades biológicas (Anand & Sharma, 1997) dentro de las que se encuentran las siguientes: antidepresivos (Aejaz, *et al*, 2012), anticancerígenos (supresión del crecimiento celular canceroso) (Akkoc, *et al*, 2012), actividad citotóxica (Akkoc, *et al*, 2012), antihelmínticos (Jain, *et al*, 2011), antibacterianos (Meher, Rao & Omar, 2013), antimicóticos (Gan, Fang & Zhou, 2010), antimicobacterianos (Joshi, Kundariya & Parmar, 2012), antipalúdicos (Ibezim, *et al*, 2012), anticonvulsivos (Mukherjee, *et al*, 2014), etc.

Por su parte otro de los heterociclos con importancia biológica es el homólogo conformacional 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano el cual se ha encontrado en la literatura que suele ser más potente que la piperazina. Este compuesto ha sido puesto en aplicación a través del agente antibacteriano basado en la quinolona, como por ejemplo por danofloxacina (Murineddu, *et al*, 2012), también Hamblett y colaboradores en 2007 informaron que la nicotinamida 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano representa una nueva clase de inhibidores de la histona deacetilasa 1 (HDAC1).



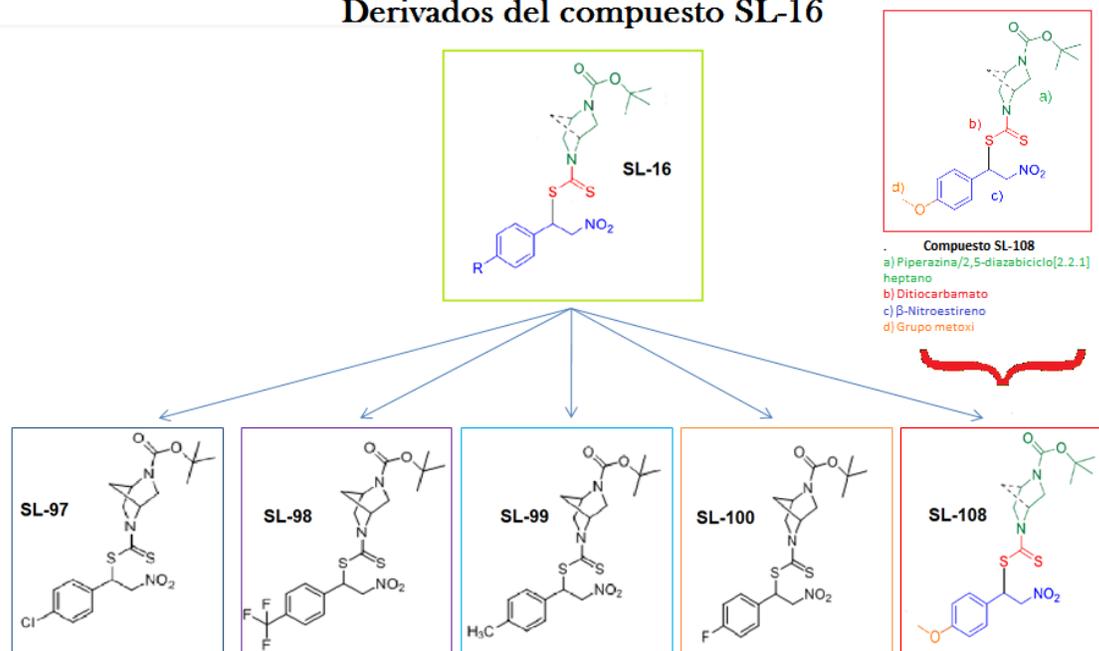
**Figura 12.** Piperazina unida a 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano. (Tomado y modificado de Laskar, et al, 2018).

En la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas, el enfoque híbrido es un camino prometedor hacia las moléculas farmacológicas que pueden atacar eficazmente las enfermedades multifactoriales, incluidos los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o múltiples tipos de cánceres que afectan a la población. Por lo cual la creación de moléculas híbridas puede utilizarse para optimizar ciertas propiedades biológicas como la afinidad y la selectividad, sino también para obtener nuevas actividades biológicas distintas de las de los componentes (Decker, 2001).

### 2.8.1. SL-108 un compuesto derivado del SL-16

Recientemente, a partir de un diseño empírico basado en las moléculas anteriormente descritas (Ditiocarbamato, Piperazina y B-Nitroestireno), se sintetizó un aducto de Michael de Piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano-ditiocarbamato con  $\beta$ -Nitroestireno, a través de una ruta fácil y libre de catalizador para lograr una nueva clase de compuesto inductor apoptótico (Laskar, Sánchez, Flores & López, 2018). Al respecto, Laskar y col., lograron obtener un compuesto con fuerte actividad antiproliferativa (SL-16), al cual posteriormente se le realizó una modificación puntual que consistió en agregar diferentes grupos funcionales en la posición 4 del anillo aromático, con la intención de potenciar su actividad antiproliferativa (SL-97, SL-98, SL-99, SL100 y SL-108) (Figura 13). De estos compuestos, el SL-108 (tert-butyl 5-(((1-(4-methoxyphenyl)-2 nitroethyl) thio) carbonothioyl)-2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptane-2-carboxylate) mostró una alta actividad antiproliferativa en células de cáncer cérvico uterino (Tabla 1) y una baja o nula actividad necrótica en células tumorales (Tabla 2), sin embargo, se desconoce su actividad inductora de muerte apoptótica en células tumorales, así como su efecto antiproliferativo y necrótico en células no tumorales, generando la necesidad de estudiarlo a mayor profundidad.

## Derivados del compuesto SL-16



**Figura 13.** Derivados del compuesto SL-16; Se hizo una modificación agregando un grupo diferente en la posición 4 del anillo aromático para cada compuesto: SL-97 R= (4-Cl), SL-98 R= (4-CF<sub>3</sub>), SL-99 R= (4-CH<sub>3</sub>), SL-100 R= (4-F) y en el compuesto SL-108 se agregó R= (4-OMe). (Tomada y modificada de Laskar, *et al*, 2018).

A su vez Laskar y colaboradores reportaron las IC<sub>50</sub> de los derivados del SL-16 (Tabla 1) en donde podemos encontrar que el compuesto SL-16 tiene las IC<sub>50</sub> más bajas a comparación de los demás derivados, sin embargo, hace falta más información sobre los demás compuestos ya que éste es el primer artículo sobre este tipo de compuestos.

IC <sub>50</sub> (µg/mL) de los derivados del SL-16				
Compuestos	Sustituyente	HeLa	CaSki	ViBo
SL-16	-H	0.42 ± 0.003	1 ± 0.007	0.31 ± 0.001
SL-97	-Cl	2.6 ± 0.041	3.3 ± 0.058	1.1 ± 0.057
SL-98	-CF <sub>3</sub>	3 ± 0.028	3 ± 0.038	3.6 ± 0.019
SL-99	-CH <sub>3</sub>	2.3 ± 0.019	2.6 ± 0.04	1.4 ± 0.011
SL-100	-F	3.5 ± 0.022	3 ± 0.031	2.9 ± 0.052
SL-108	-OMe	2.4 ± 0.034	2.8 ± 0.045	1.2 ± 0.026

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> de los derivados del SL-16 sobre líneas de cáncer cérvico uterino, reportadas por Laskar y colaboradores en 2018.

En ese mismo artículo se encuentra la actividad necrótica de cada uno de los derivados del SL-16, mostrando que estos compuestos no generan un efecto necrótico en células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo.

Compuestos	Efecto necrótico (% LDH)		
	HeLa	CaSki	ViBO
		% LDH	
<b>SL-16</b>	3±0.12	2±0.35	0±0.66
<b>SL-97</b>	4±0.85	15±0.12	12±0.42
<b>SL-98</b>	5±0.53	20±1.75	0±0.21
<b>SL-99</b>	0±0.53	2±0.64	5±0.47
<b>SL-100</b>	2±0.49	5±0.45	8±0.35
<b>SL-108</b>	0 ± 0.38	0 ± 0.27	5 ± 0.57

**Tabla 2.** Porcentajes de la actividad de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en cultivo de células de cáncer cérvico uterino, reportadas por Laskar y colaboradores en 2018.

### **3. Planteamiento del problema**

Los tratamientos contra el cáncer suelen ser poco selectivos, tóxicos e ineficientes en los estadios avanzados de la enfermedad, generando efectos colaterales que demeritan fuertemente el éxito del tratamiento y afecta significativamente la calidad de vida del paciente. Este hecho ha generado la necesidad de buscar nuevos compuestos que presenten una selectividad de células tumorales alta junto con una inducción de muerte celular por apoptosis y un efecto necrótico mínimo. Por ello en las últimas dcadas se han conocido nuevos compuestos que pueden tener estas características y puedan ser usados como agentes terapéuticos para dicha enfermedad, dentro de los que podría destacar el SL-108.

#### 4. Justificación

En México el cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte en mujeres (SS, 2015), en donde la incidencia reportada por la Secretaría de Salud en 2015 es de 23.3 casos por 100.000 mujeres, mientras que para la situación mundial se estima que es la octava neoplasia en la población y la cuarta más frecuente de entre las mujeres (SS, 2015). Por ello es importante crear alternativas que puedan resolver este problema, entre las consideradas está la búsqueda de nuevos compuestos naturales y/o sintéticos como los ditiocarbamatos, la Piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano y el  $\beta$ -Nitroestireno, los cuales presentan una diversa actividad biológica, destacándose la actividad antitumoral, antibacteriana y antioxidante. En conjunto con estos compuestos se encuentra el SL-108 de los cuales se tiene poca información acerca de su actividad en el cáncer cérvico uterino, por ello es necesario generar datos que nos ayuden a encontrar su efecto en las células tumorales.

## 5. Hipótesis

Debido a que se conoce que los diticarbamatos, la piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano y el nitroestireno presenta una actividad antiproliferativa e inductora de apoptosis de manera individual, se espera que el compuesto SL-108 (constituido por los tres compuestos), presente actividad antiproliferativa y apoptótica en líneas de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo.

## 6. Objetivos

### 6.1. Objetivo General

- ❖ Determinar el potencial antiproliferativo del compuesto SL-108 en células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo, así como valorar su efecto necrótico y su capacidad para inducir muerte celular por apoptosis.

### 6.2. Objetivos Particulares

- ❖ Determinar el efecto antiproliferativo del compuesto SL-108 en cultivos de células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo, expresado como la concentración requerida del compuesto para abatir en un 50 % el número celular ( $IC_{50}$ ), mediante la técnica de cristal violeta.
- ❖ Establecer si el compuesto SL-108 a la concentración de  $IC_{50}$ s, induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a una muerte necrótica, mediante la detección de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes celulares.
- ❖ Determinar si el compuesto SL-108 induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a presentar una morfología apoptótica (contracción celular, forma esférica, condensación de cromatina nuclear, formación de cuerpos apoptóticos, entre otros), observada por microscopía de campo claro y de epifluorescencia.
- ❖ Determinar si el compuesto SL-108 induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a presentar la caspasa-3 activa mediante inmunodetección, observadas por epifluorescencia y cuantificando las células positivas mediante citometría de flujo.
- ❖ Determinar si la  $IC_{50}$ s del compuesto SL-108 obtenidas para las células tumorales, afecta la proliferación de las células linfocíticas de sangre periférica humana, mediante la técnica de marcaje con carboxifluoresceína cuantificada por citometría de flujo.
- ❖ Establecer si el compuesto SL-108 a la concentración de  $IC_{50}$ s determinadas en las células tumorales, induce en las células linfocíticas una muerte necrótica, mediante la detección en los sobrenadantes celulares de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH).

## 7. Metodología

### Cultivo de líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo

El cultivo de líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Cada línea celular se cultivó en cajas petri de 100 mm (Corning-Pyrex, USA) adicionando 10 ml de RPMI-1640 (Microlab. S.A de C.V) al 5% de SNT (Biowest, USA). Dichos cultivos se mantuvieron en incubación a 37 %, al 5% de CO<sub>2</sub> y a punto de rocío.

### Preparación del compuesto

El compuesto SL-108 fue suministrado por el Dr. Ignacio Regla y el Dr. Laskar Sujay, del Laboratorio de "Síntesis de fármacos", ubicado en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM) (Melgar, *et al*, 2008)

En una balanza analítica se pesaron 5 mg del compuesto SL-108 y se solubilizó en 500 µl de DMSO a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 10 µl y se le añadieron 990 µl de RPMI-1640 al 5% de SNT para obtener una concentración de 0.1 µg/µl, de esta preparación se tomaron nuevamente 100 µl y se les adicionó 900 µl de RPMI-1640 al 5% de SNT (Biowest, USA) para obtener una concentración de 0.001 µg/µl con el fin de poder tomar las concentraciones deseadas para la realización de los ensayos experimentales.

### Determinación del efecto antiproliferativo a través de la tinción con cristal violeta

Se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning, USA) 3,500 células por pozo en 100 µl de medio RPMI-1640 al 5% de SNT (Biowest, USA) y se mantuvieron en una incubadora (Nuair, USA) a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y posteriormente tratadas con diferentes concentraciones del compuesto SL-108 con sus respectivos controles (un control con medio fresco y un control con DMSO al 1%) durante 24 h en la incubadora.

La determinación del número celular se hizo mediante la técnica de cristal violeta, en donde transcurrido las 24 h del estímulo, se retiró el medio a las células e inmediatamente fueron fijadas con glutaraldehído al 1.1% (Sigma-Aldrich, USA) por 20 min; posteriormente, se retiró el fijador, se lavó con agua destilada y se dejó secar al aire; después, se procedió a teñir a la células con el colorante cristal violeta al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) en una solución de ácido fórmico 200 µM por 20 min, pasado este tiempo se procedió a quitar el colorante y lavar exhaustivamente con agua para retirar el exceso de colorante y se dejó secar al aire. Por último se agregaron 100 µl de ácido acético

al 10% (J.T. Baker, USA) por 20 min para que se solubilizara el cristal violeta y se midió la absorbancia por espectrofotometría a 590 nm en un lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA).

Los datos obtenidos fueron procesados en Excel 2013 para obtener los gráficos de una curva dosis-respuesta a diferentes concentraciones del compuesto, a la cual se le aplicó una linealización y con la ecuación de la recta se calculó la  $IC_{50}$  (la concentración a la cual se disminuye el 50% de la población celular).

### **Cuantificación de la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa**

En placas de 96 pozos (Corning, USA) se sembraron 3500 células de cada una de las tres líneas celulares con 100  $\mu$ l de medio RPMI-1640 al 5% de SNT (Biowest, USA) y se incubaron a 37°C, al 5% de  $CO_2$  por 24 h. Después de ese tiempo se retiró el medio de cultivo y se le adicionaron las siguientes condiciones: un control con medio de cultivo fresco que fue utilizado como blanco en la reacción, un control positivo en el cual las células fueron lisadas con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) en RPMI-1640 al 5% de SNT por una hora, un control con DMSO y por último las concentraciones de  $IC_{50}$  determinadas para cada línea.

Pasado 24 h de la aplicación de los tratamientos se procede a transferir el medio de cultivo a una placa de 96 pozos fondo cónico (Corning Incorporat, USA) para centrifugar (Centrifuga Orto alresa) a 4000 rpm a una temperatura de 4°C por 5 min, una vez centrifugado se recuperaron 40  $\mu$ l del medio y se vertieron a un placa de fondo plano y se agregaron 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción Kit Cyto Tox 96® Non-Radiative Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) a cada condición por 20 min a temperatura ambiente y protegida de la luz. Finalmente se midió la absorbancia usando el lector de placas (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA) a 490 nm. Los datos arrojados fueron procesados en el programa Excel 2013 para obtener los gráficos que mostrarán el efecto citotóxico de cada uno de los tratamientos.

### **Evaluación de la morfología celular, condensación de cromatina a través de la tinción con DAPI e inmunodetección de caspasa 3 activa**

Se cultivaron células HeLa, CaSki y ViBo en cajas estériles de 96 pozos (Corning, USA) a una densidad de 3500 células por pozo con un volumen de 100  $\mu$ l de RPMI-1640 al 5% de SNT (Biowest, USA), se dejaron incubar por 24 h para la adhesión de las células. Pasadas las 24 h se estimularon con las siguientes condiciones: Un control conteniendo células sin ningún tratamiento, un control con DMSO (1%), un control positivo para apoptosis con camptotecina (Sigma-Aldrich, USA) y por último las  $IC_{50}$ s del compuesto SL-108 para cada línea. Transcurrido 24 h en incubación, se procede a fijar

las células con una mezcla de paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich, USA) con glutaraldehído al 2.5% (Sigma-Aldrich, USA) en PBS por 2 h, al término del tiempo se lavó cinco veces con PBS filtrado en esterilidad, seguidamente se permeó con 30  $\mu$ l de Tritón X-100 al 0.5% (Sigma-Aldrich, USA) durante 5 min, terminado este lapso se lavó cinco veces cada condición con 100  $\mu$ l de PBS. Posteriormente se agregó 30  $\mu$ l de anticuerpo 1° (1:500  $\mu$ l en PBS) policlonal de conejo anticaspasa-3 activa (Sigma-Aldrich, USA), se dejó toda la noche a 4°C en agitación. Después se lavó cinco veces con PBS filtrado, seguidamente se incubó con el anticuerpo secundario anticonejo acoplado con fluorocromo FIT-C (1:500  $\mu$ l de PBS) (Sigma-Aldrich, USA) en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo se lavó cinco veces con 100  $\mu$ l de PBS para poder agregar 15  $\mu$ l del fluorocromo DAPI durante 5 min, se lavó de nuevo cinco veces con PBS y por último se colocaron 50  $\mu$ l de PBS filtrado para su observación a través de microscopia de epifluorescencia (Microscopio Nikon ECLIPSE TS2R-FL, Japón).

### **Inmunodetección de caspasa-3 activa mediante la técnica de citometría de flujo**

Se sembraron 350,000 células provenientes de líneas celulares de CaCU en placas de cultivo (Corning, USA) de 6 pozos, con un volumen de 5 ml de RPMI-1640 al 5 % de SNT (Biowest, USA), se incubaron por 24 h a 37 %, al 5% de CO<sub>2</sub> y a punto de rocío. Pasado las 24 h los cultivos fueron tratados con las respectivas condiciones: un control al cual se cambió el medio de cultivo por medio fresco, un vehículo donde se agregó la concentración de DMSO (1%), un control positivo para el proceso de apoptosis con camptotecina (Sigma- Aldrich, USA) y las concentraciones de CI<sub>50s</sub> obtenidas para cada línea celular, se incubaron por 24 h.

Después de un total de 48 h de cultivo, se realizó la detección de la caspasa-3 activa por citometría de flujo; para lo cual las células fueron despegadas con verseno por 5 min para el caso de HeLa y CaSki y tripsina 3 min para ViBo, una vez despegadas las células se cosecharon en tubos (Falcon™) para citometría (tubo por condición), se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 min, una vez decantado cada tubo se agregó 500  $\mu$ l de PBS con el cual se resuspendió el botón celular y luego se agregó 500  $\mu$ l de metanol al 50% durante 1 h a 4°C. Al término del tiempo, los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 5 min y se realizaron 3 lavados con PBS filtrado, considerando que entre cada lavado se decanta el sobrenadante. Posteriormente se adicionó 50  $\mu$ l de anticuerpo 1° (1:500  $\mu$ l de PBS) policlonal de conejo anticaspasa-3 activa resuspendiendo el botón celular y se dejó incubar toda la noche a 4°C.

Después del tiempo del anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas con PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se agregó el anticuerpo 2° anticonejo acoplado con el fluorocromo FIT-C (1:500  $\mu$ l en PBS), se dejó incubar 2 h a una temperatura de

37°C. Finalmente las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, centrifugadas y decantadas para obtener el botón celular que fue resuspendido en 500  $\mu$ l de PBS para analizar las muestras en el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA). Los datos que fueron obtenidos fueron analizados a través del programa Flowjo 7.6.1 Min, Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **Proliferación de linfocitos humanos a través de la técnica de marcaje con carboxifluoresceína (CSFE)**

Se obtuvieron 25 ml de sangre periférica de un donante clínicamente sano en tubos de BD-Vacutainer® (EDTA 10.8 mg/tubo).

En tubos cónicos de vidrio de 15 ml (Pirex, USA), se colocaron 5 ml de Ficoll-Hysopaque (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, la sangre se agregó lentamente por la pared del tubo. Estas muestras se centrifugaron inicialmente a 300 rpm durante 5 min y se incrementó la velocidad gradualmente 300 rpm cada 5 min hasta llegar a las 1500 rpm por otros 20 min más. Una vez centrifugadas las muestras, las células fueron separadas por gradiente de densidad, una vez obtenidos los diferentes componentes celulares, se recolectaron los anillos de linfocitos evitando extraer el ficoll. Dichos anillos se colocaron en tubos de vidrio cónico, agregándoles 5 ml de RPMI sin suero. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min, de esa manera se realizaron dos lavados decantando entre cada centrifugado.

El botón celular se resuspendió en un volumen de 5 ml de RPMI-1640 para poder contarlos en la cámara de Neubauer, una vez contabilizados los linfocitos, se procedió a marcarlos agregando 50  $\mu$ l de CSFE (200  $\mu$ M/mL RPMI) (Sigma-Aldrich, USA) durante 15 min protegiéndolos de la luz, posteriormente se realizaron dos lavados agregando 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 5% de SFB (Biowest, USA) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se decantaron y se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo RPMI-1640 al 20% de SFB (Biowest, USA). A continuación se procedió a activar a los linfocitos con PHA (20  $\mu$ l/mL RPMI-1640).

Se sembraron en una placa de 96 pozos por quintuplicado 200,000 linfocitos/pozo en 200  $\mu$ l de RPMI-1640 al 20% de SFB (Biowest, USA), los linfocitos se sembraron teniendo en cuenta las siguientes condiciones : control sin activar -,- (con CSFE y sin PHA), control activado +,- (con CSFE y con PHA), control -,+ (sin CFSE y con PHA) y un control +,+ (con CFSE y con PHA), esta placa se dejó en condiciones de cultivo por 48 h (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, atmosfera húmeda).

Una vez transcurridas las 48 h de incubación, se procedió a retirar 100  $\mu$ L/pozo de los controles. A los controles (-,-) y al (+,-) se le agregó 100  $\mu$ l/pozo de RPMI-1640 al 20% de SFB fresco, mientras que a los controles (-, +) y al (+,+) se les agregó 100  $\mu$ L/pozo de RPMI-1640 al 20% de SFB con

PHA. Asimismo, se retiró 100  $\mu$ L/pozo de los pozos asignados para probar las IC<sub>50</sub> respectivas de cada línea celular. A las 48 h de cultivo, se agregó por quintuplicado los 100  $\mu$ L de las respectivas IC<sub>50</sub> (2x) y del DMSO. Se mantuvieron las condiciones de cultivo por 24 h más.

Transcurrida las 72 h se recolectaron los linfocitos en tubos de citometría uno por condición y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante decantando los tubos y agregando 500  $\mu$ l de verseno, después se realizaron dos lavados y se centrifugaron para obtener el botón celular que fue resuspendido en 500  $\mu$ l de PBS filtrado para poder analizar las muestras en el citómetro de flujo (BD FACSAria II, USA) y los datos obtenidos fueron analizados en el programa FlowJo 7.6.1 Min.

### **Determinación de la actividad necrótica en linfocitos humanos mediante la actividad de LDH**

A las 24 h transcurridas del estímulo de IC<sub>50</sub>s se transfirió 60  $\mu$ l del sobrenadante de cada cultivo de linfocitos en una placa de fondo cónico (Corning, USA), previamente una hora antes se lisaron las células con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA) para obtener el control positivo. Se procedió a centrifugar los sobrenadantes a 4000 rpm a una temperatura de 4°C por 5 min, después se transfirieron 40  $\mu$ l de este medio a una placa de fondo plano (Corning, USA) para agregar 40  $\mu$ l de la mezcla de reacción Kit Cyto Tox 96® Non-Radiactive Cytotoxicity Assay (Promega, Corporation, USA) por 20 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un lector de placas ELISA (Awarenes Technology INC, ChroMate, USA).

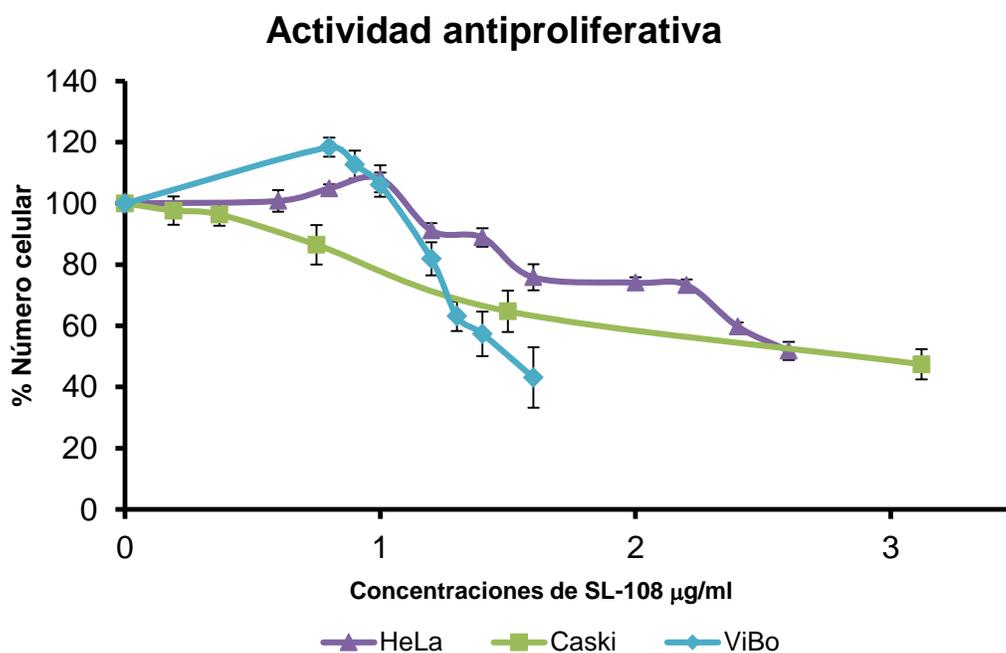
### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos experimentalmente fueron presentados como la media de tres ensayos independientes y fueron analizados estadísticamente en el programa Excel 2013 usando un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$  comparados contra el control.

## 8. Resultados

### Actividad antiproliferativa en células tumorales

Con el fin de establecer si el compuesto SL-108 tiene un efecto antiproliferativo sobre las líneas de cáncer cérvico uterino, cultivos de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con diferentes concentraciones del compuesto por 24 h y el número celular fue evaluado a través de la técnica por incorporación del colorante cristal violeta y la concentración que abate en un 50% el número celular ( $IC_{50}$ ) fue calculada (Figura 14 y Tabla 3).



**Figura 14.** Actividad antiproliferativa del compuesto SL-108 sobre las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo. El número celular se evaluó mediante la técnica de cristal violeta. Se realizó una prueba estadística (ANDEVA) con una significancia del  $p < 0.05\%$ , seguida de una prueba de Tukey.

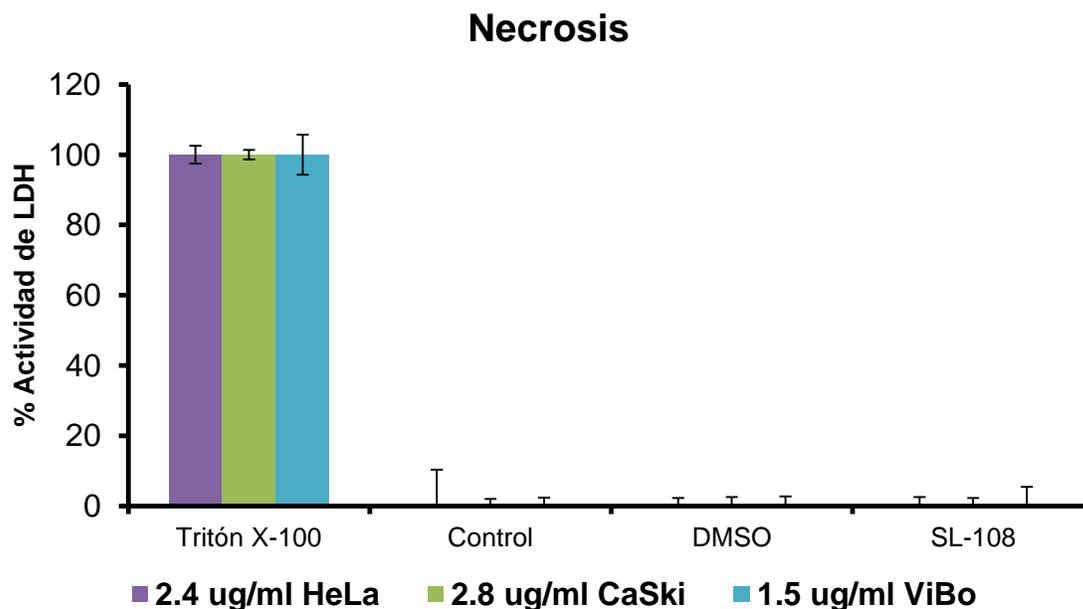
Los resultados obtenidos establecen que el SL-108 afecta el potencial proliferativo de las tres líneas tumorales de una manera dependiente de la dosis, es decir, conforme se incrementa la concentración del compuesto, el número celular disminuye. Los valores de la concentración que abate en un 50 % el número celular son mostrados en la tabla 3.

Línea Celular	IC <sub>50</sub> µg/ml	IC <sub>50</sub> µM
<b>ViBo (Negativa a VPH)</b>	1.5	2.64
<b>HeLa (Positiva a VPH 16)</b>	2.4	5.29
<b>CaSki (Positiva a VPH 18)</b>	2.8	6.17

**Tabla 3.** Se muestran los valores de IC<sub>50</sub> para cada línea celular de cáncer cérvico uterino.

### Efecto necrótico del compuesto SL-108 en células tumorales

Es conocido que el decremento en el número celular inducido por algún compuesto podría estar generado por una acción citotóxica. Con el propósito de determinar si el compuesto SL-108 presenta una actividad citotóxica (necrótica) sobre las líneas celulares de cáncer cérvico uterino, cultivos de células CaSki, HeLa y ViBo fueron tratadas con las concentraciones de su IC<sub>50</sub> y la actividad citotóxica (necrótica) fue evaluada mediante la detección de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de los cultivos celulares (Figura 15).



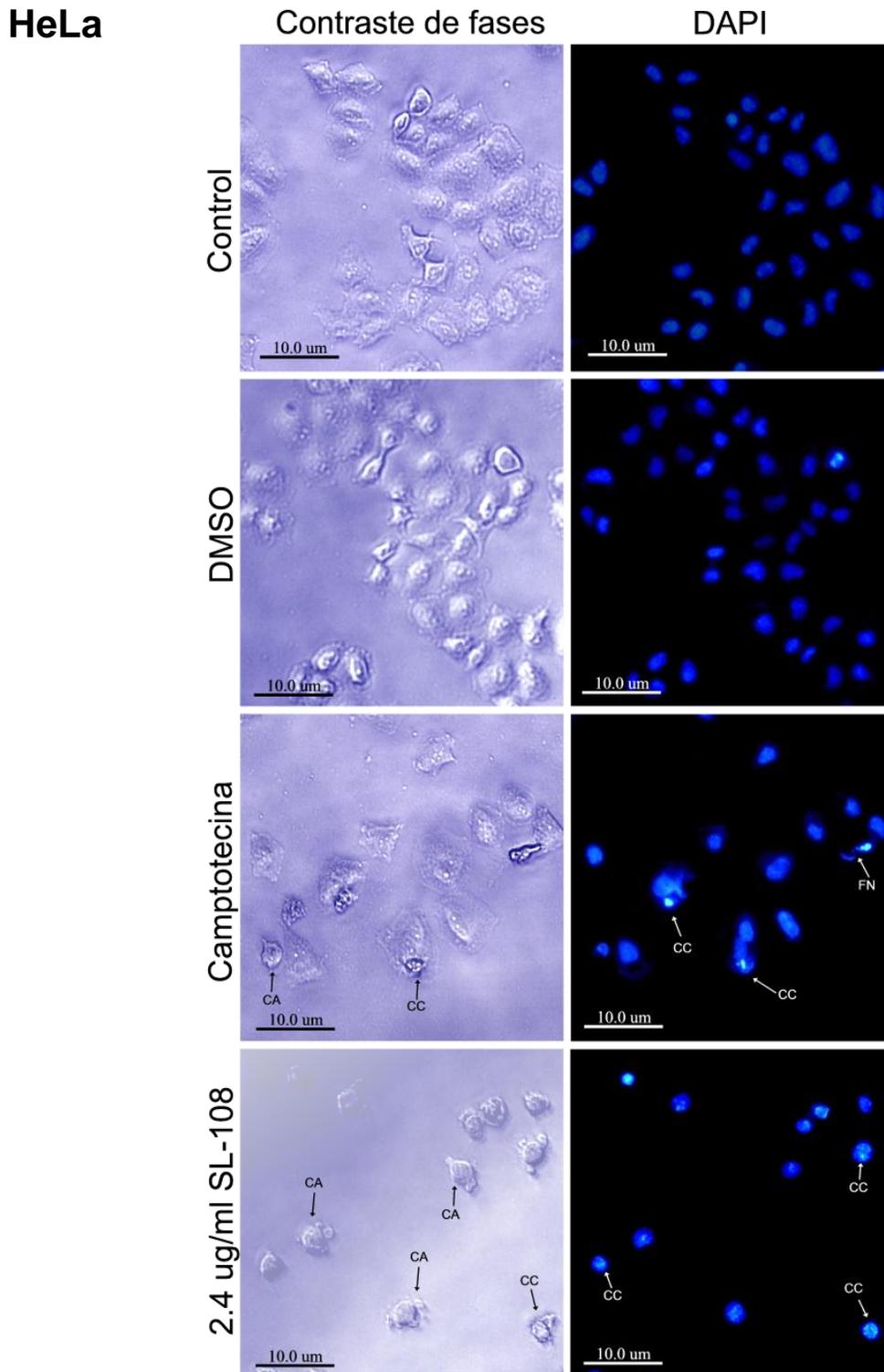
**Figura 15.** Se muestran los porcentajes de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de las líneas celulares HeLa, CaSki y ViBo tratadas con la IC<sub>50</sub> respectivas del compuesto SL-108. El Tritón X-100 representa el control positivo donde se observa la máxima cantidad de LDH. Se realizó una prueba estadística ANDEVA con una significancia del  $p < 0.05\%$ , seguida de una prueba de Tukey.

Los resultados obtenidos en la prueba de actividad de LDH muestran que en los sobrenadantes de los cultivos celulares de cáncer cérvico uterino tratados con el compuesto SL-108 no presentan actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, lo que sugiere que el compuesto no induce una muerte necrótica, por lo que el decremento celular observado puede deberse a otra causa de muerte diferente a la muerte necrótica.

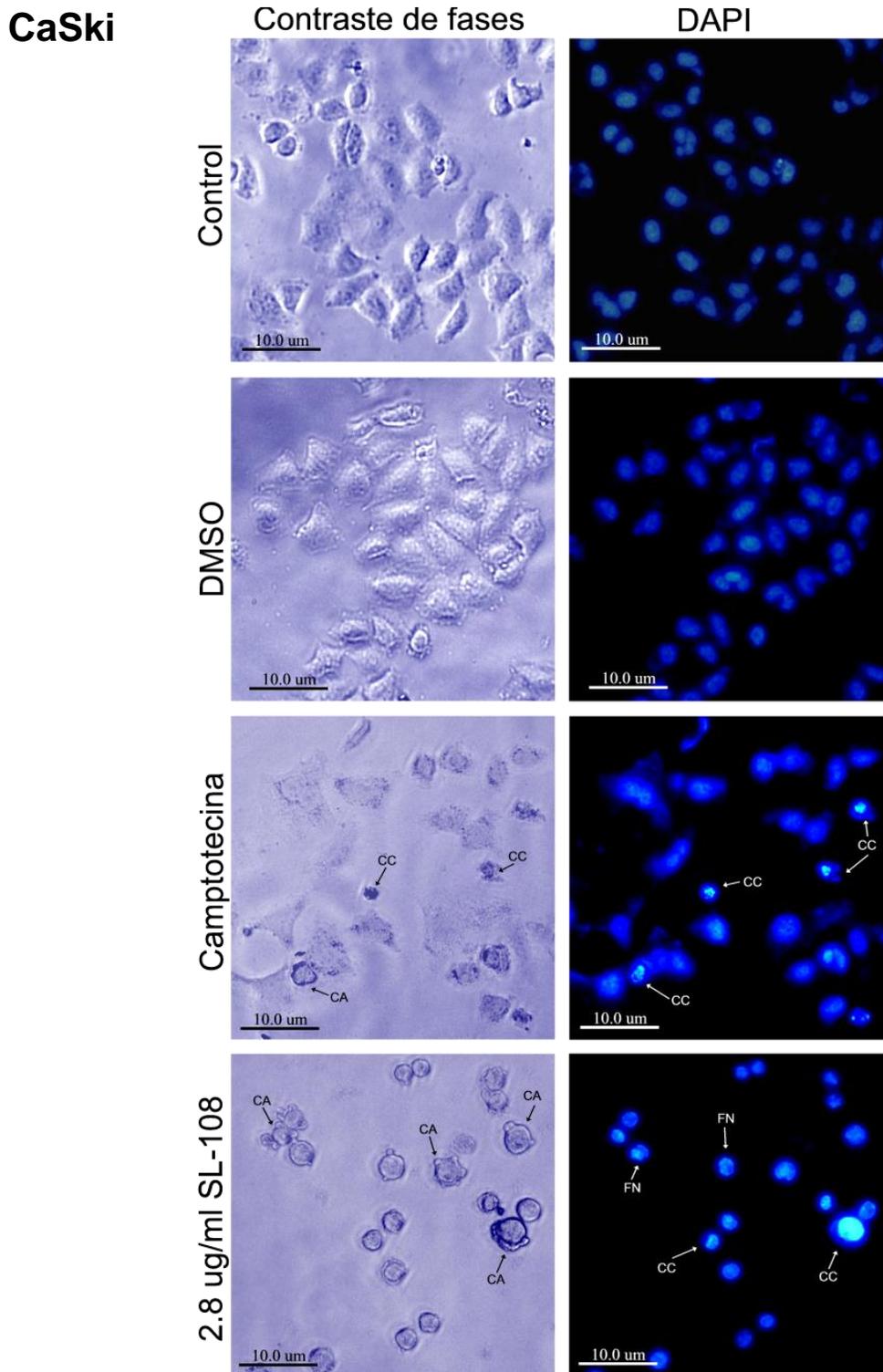
### **Actividad apoptótica en células tumorales**

#### **Evaluación de la morfología celular como un rasgo de muerte apoptótica**

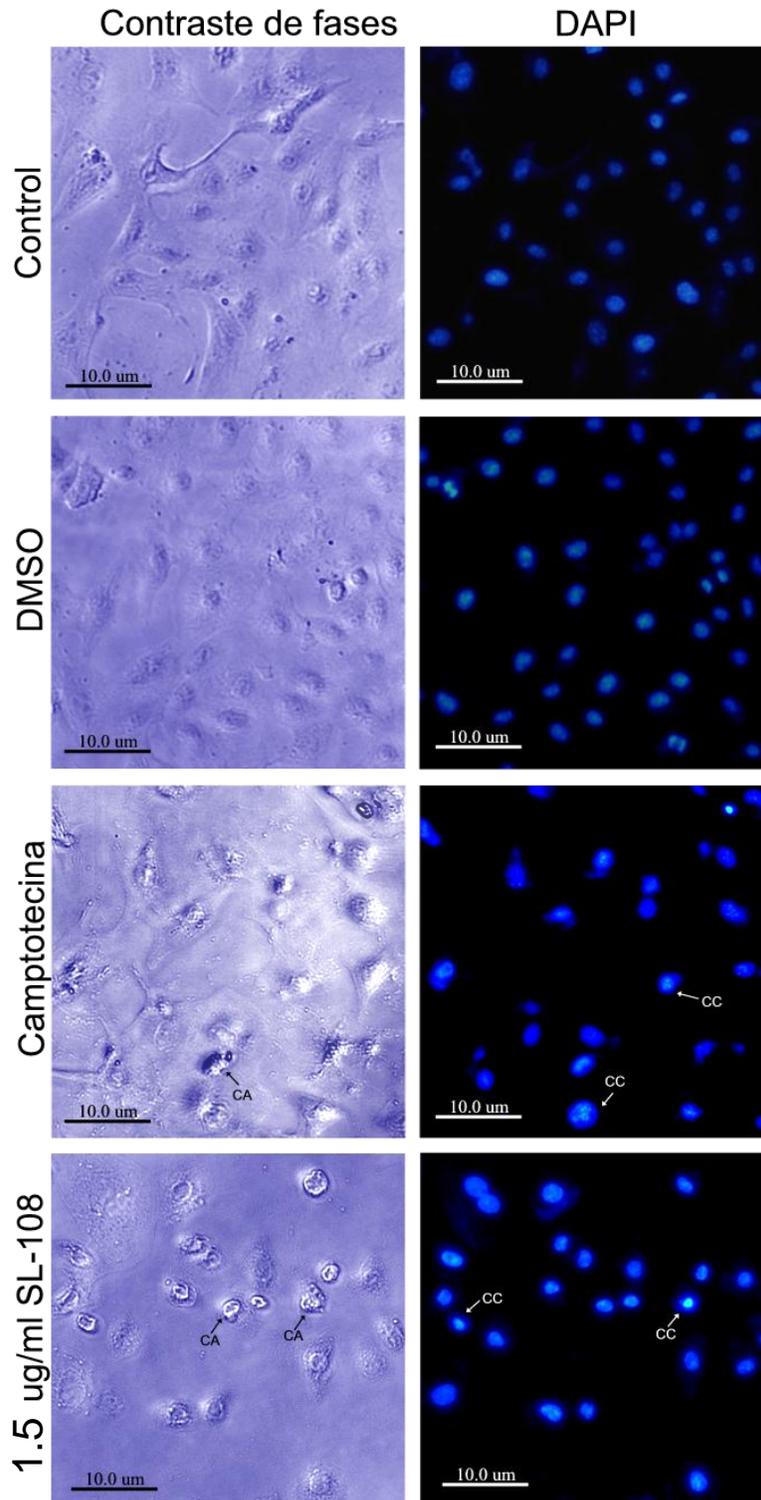
Una vez que se determinó que el compuesto SL-108 no induce una muerte necrótica, se consideró evaluar si este compuesto induce a las células tumorales a presentar los rasgos morfológicos característicos de una célula apoptótica. Para ello, cultivos de células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el SL-108 a sus respectivas  $IC_{50}$  por 24 h y la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la presencia de cuerpos apoptóticos fue observada por microscopia de campo claro y epifluorescencia mediante la incorporación del fluorocromo DAPI (Figura 16, 17 y 18).



**Figura 16.** Morfología celular de las células HeLa tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placa de 96 pozos, se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (2.4 $\mu$ g/ml) del compuesto por 24 h. Después se fijaron y se tiñeron con el fluorocromo DAPI para su observación por microscopía de campo claro y epifluorescencia. Las flechas indican: (CC) Compactación de la cromatina, (CA) Cuerpos apoptóticos y (FN) Fragmentación nuclear.



**Figura 17.** Morfología de las células CaSki tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placa de 96 pozos, se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (2.8  $\mu\text{g/ml}$ ) del compuesto por 24 h. Después se fijaron y se tiñeron con el fluorocromo DAPI para su observación por microscopía de campo claro y epifluorescencia. Las flechas indican: (CC) Compactación de la cromatina, (CA) Cuerpos apoptóticos y (FN) Fragmentación nuclear.

**ViBo**

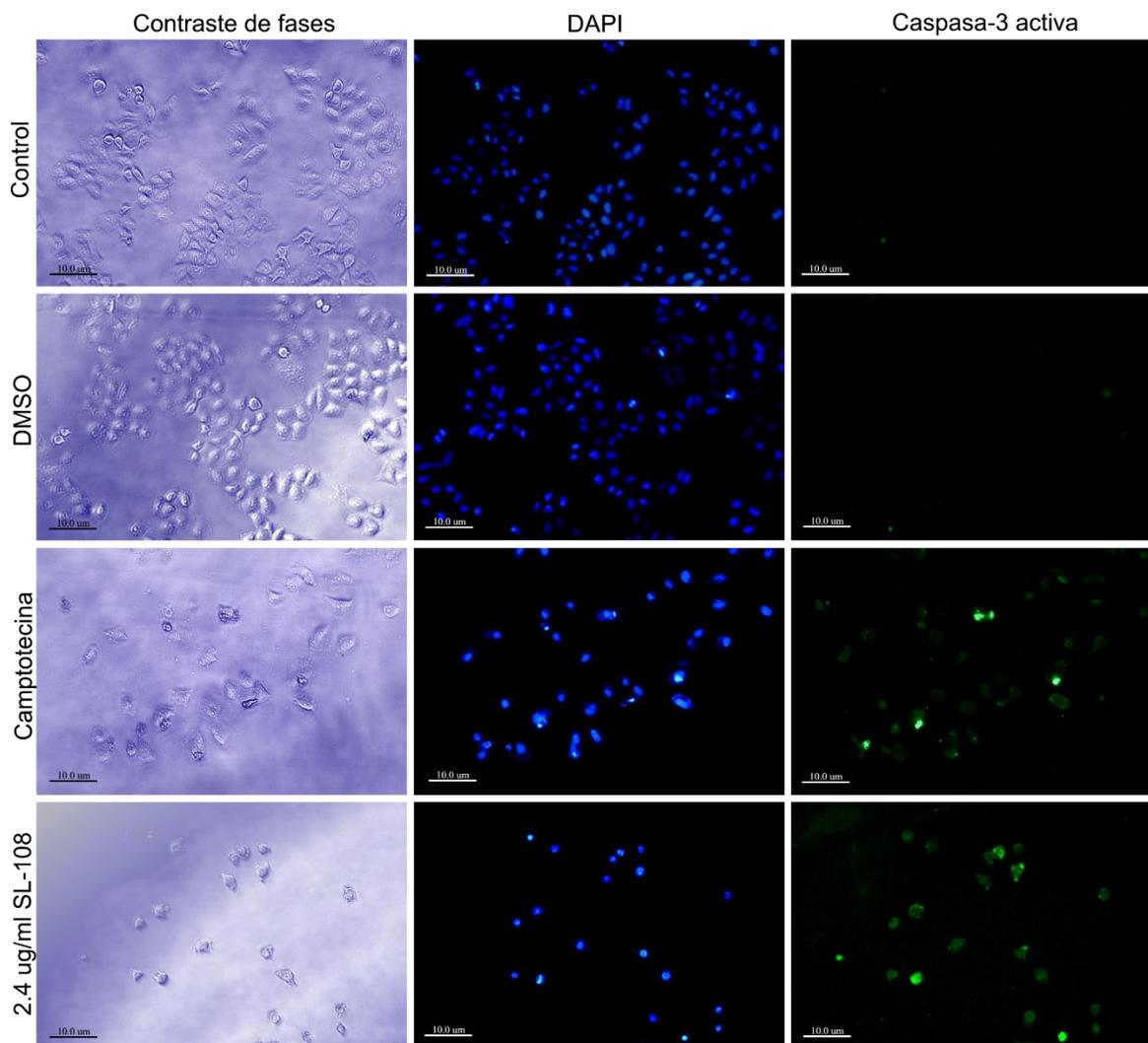
**Figura 18.** Morfología de las células ViBo tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placa de 96 pozos, se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (1.5  $\mu$ g/ml) del compuesto por 24 h. Después se fijaron y se tiñeron con el fluorocromo DAPI para su observación por microscopía de campo claro y epifluorescencia. Las flechas indican: (CC) Compactación de la cromatina, (CA) Cuerpos apoptóticos y (FN) Fragmentación nuclear.

Los resultados observados en las figuras 16, 17 y 18 establecen que el compuesto SL-108 induce a las líneas de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo a presentar una morfología característica de una célula apoptótica como lo es la contracción celular con pérdida de las proyecciones citoplasmáticas, la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la observación de los cuerpos apoptóticos, lo que sugiere que el compuesto induce a las células tumorales a una muerte por apoptosis.

### **Detección de la caspasa-3 activa mediante microcopia de epifluorescencia**

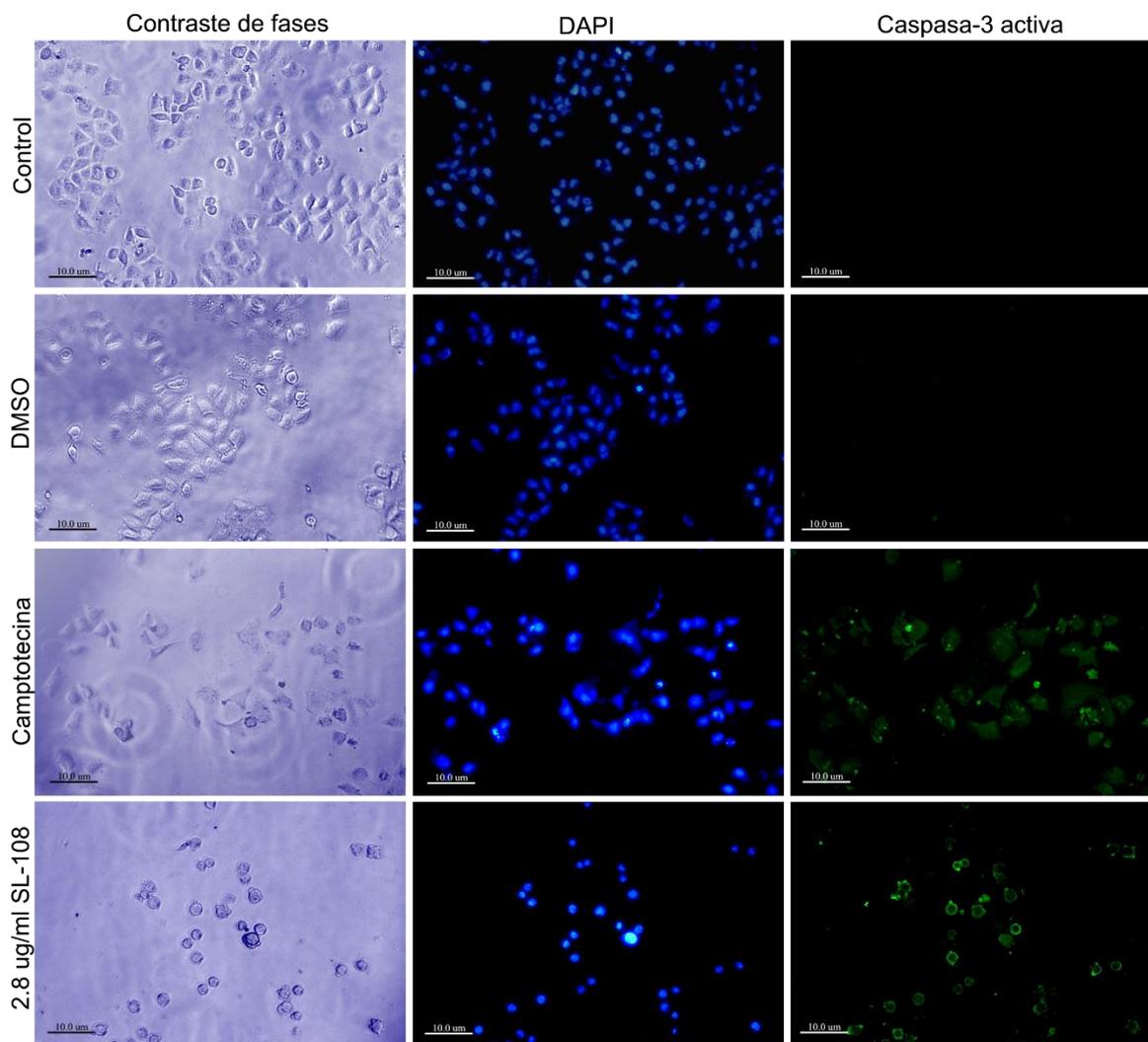
Con el fin de comprobar que el compuesto SL-108 induce una muerte apoptótica en líneas de células de cáncer cérvico uterino, las líneas HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con el compuesto SL-108 a sus respectivas  $IC_{50}$  y la caspasa-3 activa fue inmunodetectada y observada mediante microscopia de epifluorescencia (Figura 19, 20 y 21).

## HeLa



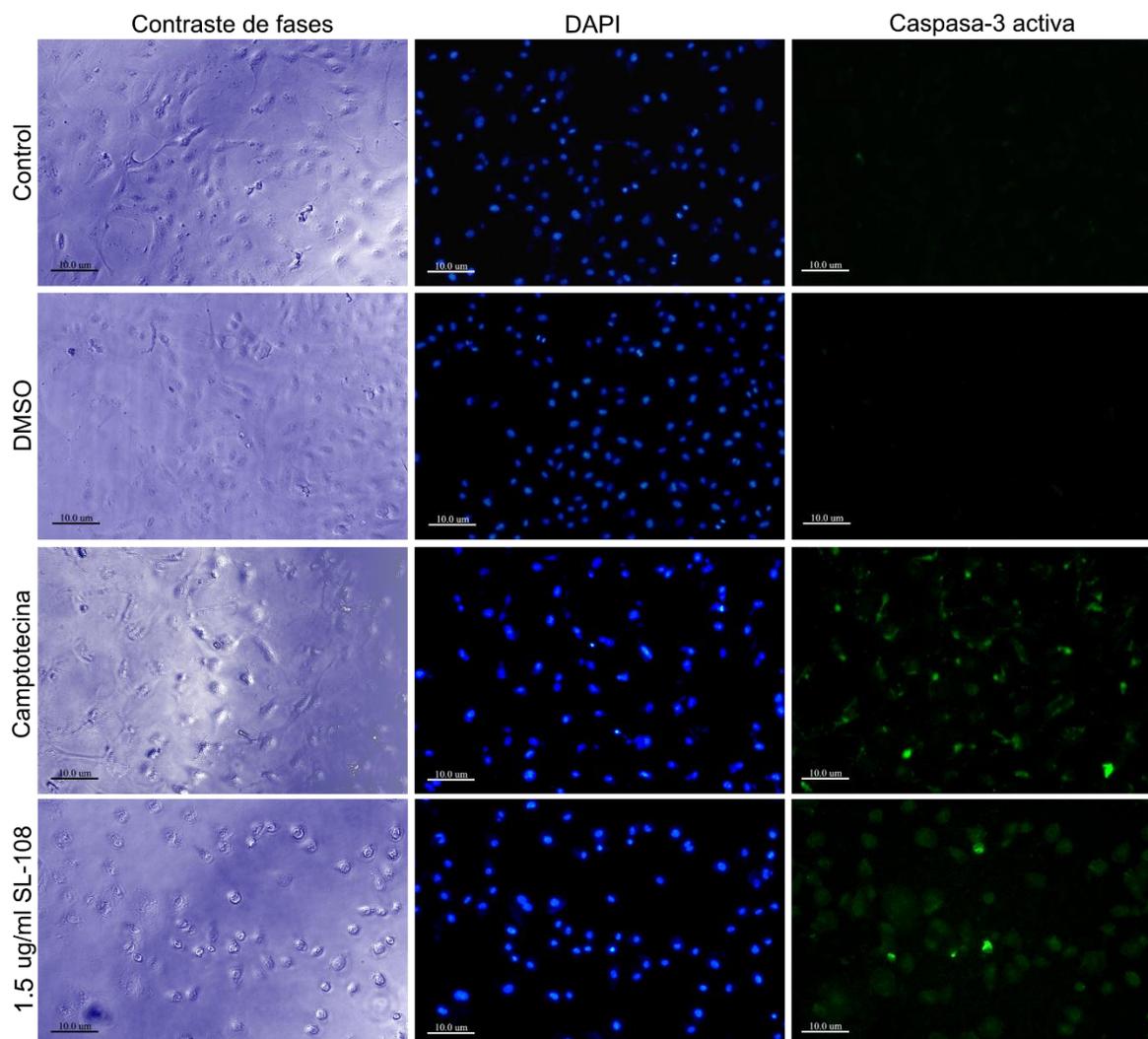
**Figura 19.** Morfología celular y detección de caspasa-3 activa en células HeLa tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placas de 96 pozos y se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (2.4  $\mu$ g/ml) por 24 h. Posteriormente se fijaron, se permearon y se les adicionó el fluorocromo DAPI y el Anticuerpo 2° unido a FIT-C para su observación en el microscopio de campo claro y epifluorescencia.

## CaSki



**Figura 20.** Morfología celular y detección de caspasa-3 activa en células CaSki tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placas de 96 pozos y se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (2.8  $\mu$ g/ml) por 24 h. Posteriormente se fijaron, se permearon y se les adicionó el fluorocromo DAPI y el Anticuerpo 2° unido a FIT-C para su observación en el microscopio de campo claro y epifluorescencia

## ViBo



**Figura 21.** Morfología celular y detección de caspasa-3 activa en células ViBo tratadas con el compuesto SL-108. Se sembraron 3.500 células en placas de 96 pozos y se estimularon con su respectiva  $IC_{50}$  (1.5  $\mu$ g/ml) por 24 h. Posteriormente se fijaron, se permearon y se les adicionó el fluorocromo DAPI y el Anticuerpo 2° unido a FIT-C para su observación en el microscopio de campo claro y epifluorescencia.

Los resultados que se presentan en las figuras 19, 20 y 21 muestran que las células HeLa, CaSki y ViBo tratadas con el compuesto SL-108 presentan una morfología característica de una muerte apoptótica así como la presencia de la caspasa-3 activa, lo que confirma que el compuesto SL-108 induce a las células tumorales a una muerte apoptótica dependiente de caspasa 3.

### **Caspasa-3 activa cuantificada por citometría de flujo**

Una vez que se confirmó que el compuesto SL-108 induce una muerte apoptótica en células de cáncer cérvico uterino, se procedió a cuantificar la caspasa-3 activa para determinar el porcentaje de células positivas en la población celular. Para ello, células HeLa, CaSki y ViBo fueron tratadas con las  $IC_{50}$  (Tabla 3) del compuesto y la caspasa-3 activa fue inmunodetectada y el porcentaje de células positivas a esta caspasa fue cuantificada por citometría de flujo (Figura 22, Tabla 4).

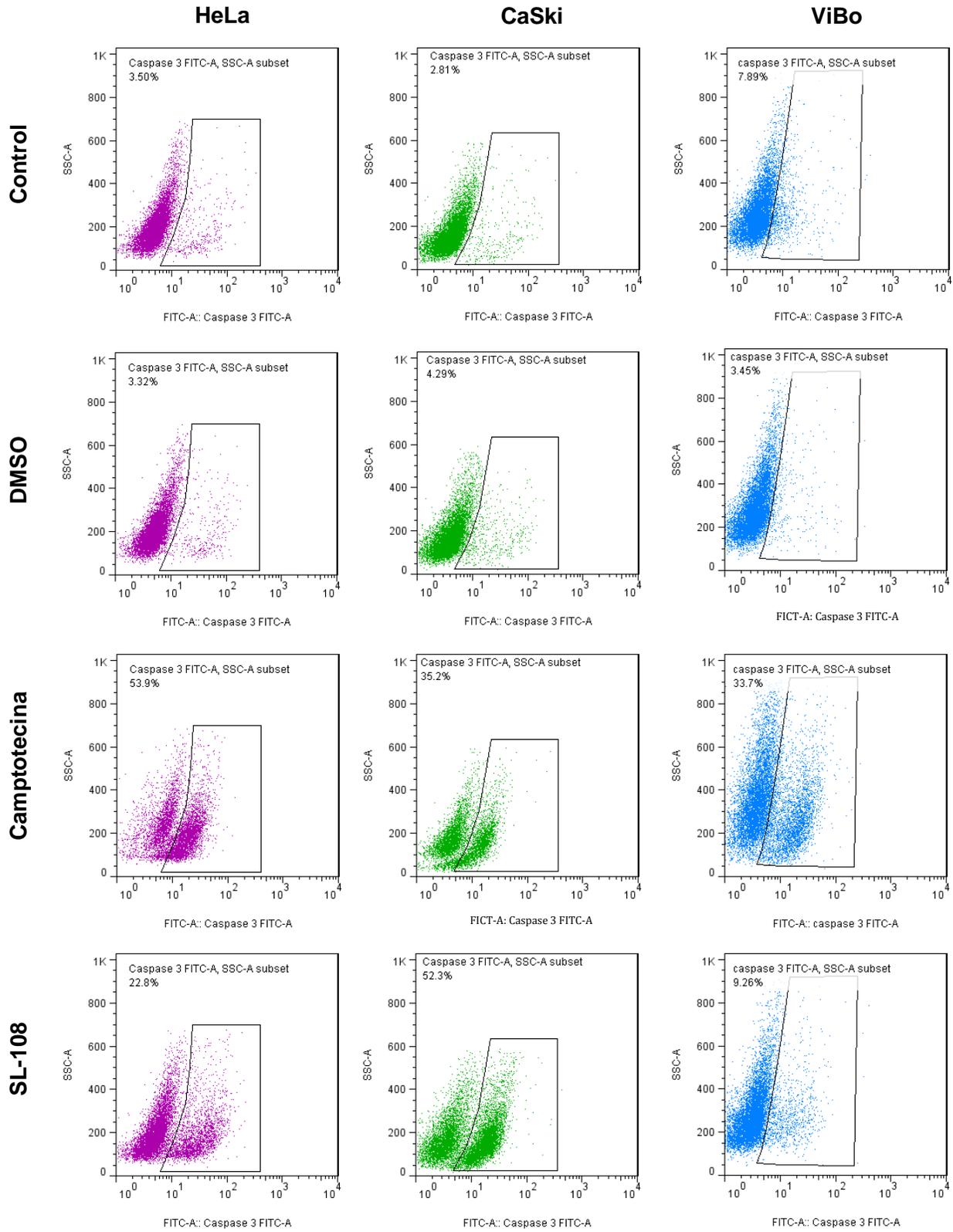


Figura 22. Porcentaje de células positivas a caspasa-3 activa en células tumorales tratadas con el SL-108.

Línea celular	Control	DMSO	Camptotecina	Compuesto SL-108
HeLa	3.50 %	3.32 %	53.9 %	22.8 %
CaSki	2.81 %	4.29 %	35.2 %	52.3 %
ViBo	7.89 %	3.45 %	33.7 %	9.26 %

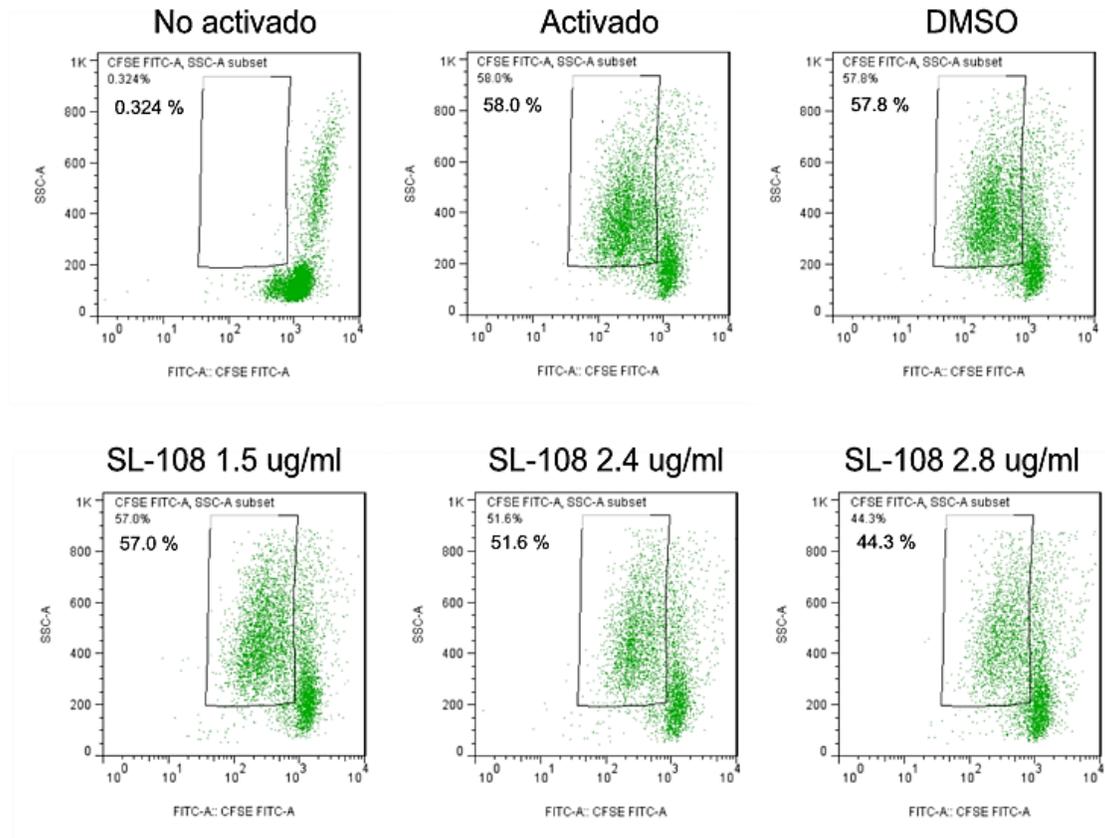
**Tabla 4.** Porcentajes de expresión de caspasa-3 activa en las líneas celulares de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki, ViBo así como el control positivo (Camptotecina) a muerte apoptótica.

Los resultados mostrados en la figura 22 demuestran que el compuesto SL-108 induce a las células HeLa, CaSki y ViBo a presentar la caspasa-3 activa, confirmando que el compuesto SL-108 induce a las células tumorales a una muerte apoptótica dependiente de caspasa -3.

### Actividad antiproliferativa del compuesto SL-108 en linfocitos humanos

Una vez que la actividad antiproliferativa del compuesto SL-108 fue establecida en las líneas de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo así como su actividad apoptótica en dichas células, se consideró pertinente probar la actividad antiproliferativa en células linfocíticas (no tumorales), con la intención de establecer si el compuesto SL-108 presenta una acción selectiva. Para esto, cultivos de células linfocíticas de sangre periférica humana marcadas con carboxifluoresceína, fueron tratados con las concentraciones de 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , 2.4  $\mu\text{g/ml}$  y 2.8  $\mu\text{g/ml}$  del compuesto y el porcentaje de proliferación celular fue determinada por citometría de flujo (Figura 23).

## Linfocitos



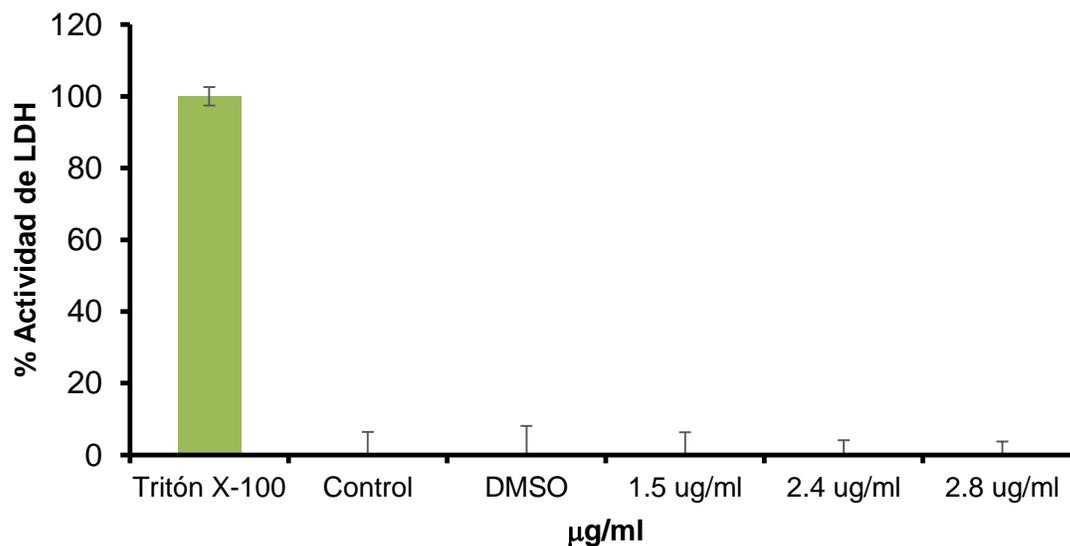
**Figura 23.** Efecto del compuesto SL-108 en la proliferación de células linfocíticas provenientes de sangre periférica humana activados con fitohemaglutinina (PHA) y marcados con carboxifluoresceína (CFSE). Las células linfocíticas fueron tratadas con 1.5, 2.4 y 2.8  $\mu\text{g/ml}$  de compuesto.

Los datos observados en la figura 23 muestran que el compuesto SL-108 a concentraciones de 1.5, 2.4 y 2.8  $\mu\text{g/ml}$ , no afecta el potencial proliferativo de las células linfocíticas, sugiriendo una acción selectiva.

### Actividad necrótica en células no tumorales

Con la intención de evaluar la actividad necrótica del compuesto SL-108 en cultivos de células linfocíticas, cultivos de linfocitos fueron tratados con 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , 2.4  $\mu\text{g/ml}$  y 2.8  $\mu\text{g/ml}$  y la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) fue determinada en los sobrenadantes celulares de los cultivos tratados y considerada como un marcador de muerte celular necrótica (Figura 24).

### Actividad necrótica en linfocitos



**Figura 24.** Porcentajes de actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos. Las células linfocíticas fueron tratadas con 1.5 µg/ml, 2.4 µg/ml y 2.8 µg/ml. El Tritón X-100 representa el control positivo donde se observa la máxima cantidad de LDH. Se realizó una prueba estadística ANOVA con una significancia del  $p < 0.05\%$ , seguida de una prueba de Tukey.

Al igual que en las células tumorales, no se reportan actividad de la enzima lactato deshidrogenasas en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos tratados con el compuesto SL-108, por lo que la disminución de la densidad de linfocitos puede deberse a otra causa diferente de muerte necrótica.

## 9. Discusión

Los tratamientos contra el cáncer aplicados actualmente resultan ser exitosos en pacientes con tumores únicos, de tamaño pequeño y detectados tempranamente. Sin embargo, en pacientes con la enfermedad avanzada, terminales o metastásicos, estos tratamientos resultan ser ineficientes, poco selectivos y con efectos secundarios graves. Debido a esto se han buscado nuevos compuestos que tengan una actividad antiproliferativa, de baja toxicidad y con acción selectiva. Dentro de estos compuestos se encuentran los ditiocarbamatos, el  $\beta$ -Nitroestireno y la Piperazina / 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano que por sí solos se han reportado en la literatura como agentes que pueden inhibir el crecimiento de células tumorales y otras actividades biológicas propias de cada uno, lo que los hace ser moléculas importantes para la creación de nuevos compuestos.

Actualmente la hibridación molecular ha tomado una gran importancia, considerada hoy en día una de las estrategias aplicadas con éxito para el diseño y síntesis de agentes biológicos novedosos y eficientes. La hibridación molecular implica la combinación de dos farmacóforos distintos para formar nuevas moléculas híbridas con importancia biológica (Mao, et al, 2016). A través de dicho proceso fue como se dio origen a los compuestos SL-16, SL-97, SL-98, SL-99, SL-100 y SL-108 con el fin de sintetizar nuevas moléculas que pudieran ser más eficientes, con baja actividad necrótica y de acción selectiva.

Se ha reportado en la literatura la actividad antiproliferativa del ditiocarbamato DTC-1, el cual se ha encontrado que tiene una  $IC_{50}$  de 7.3  $\mu$ M en células HeLa (Li, et al, 2015), a su vez también se demostró que el compuesto CYT-Rx20 (3'-hidroxi-4'-metoxi- $\beta$ -metil - $\beta$ -nitroestireno) un derivado del  $\beta$ -nitroestireno tiene propiedades antiproliferativas en células HeLa, CaSki y SiHa mostrando unas  $IC_{50}$  de 1.84, 1.72 y 3.08  $\mu$ g/ml respectivamente (Wang, Hsieh, et al, 2017), por su parte She y Hao en 2013 demostraron por primera vez un compuesto que contiene piperazina que posee una potente actividad anticancerígena en células HeLa con una  $IC_{50}$  de 0.155  $\mu$ M y por último un compuesto basado en la molécula 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano, mostró tener una actividad antiproliferativa sobre células CaSki con una  $IC_{50}$  de 28  $\mu$ g/ml (Laskar, et al, 2017). Con respecto a los resultados obtenidos en este trabajo, los valores de  $IC_{50}$  del compuesto SL-108 en células de cáncer cérvico uterino son parecidos a los descritos por Sujay y colaboradores en 2018, mostrando una actividad antiproliferativa dosis dependiente, es decir entre más aumenta la concentración de compuesto, se puede observar una disminución del número celular. Estas concentraciones resultan ser altas si se comparan con las del compuesto CYT-Rx20 en células HeLa y CaSki y con el derivado de piperazina en células HeLa, pero menores en comparación con las del ditiocarbamato DTC-1 y el compuesto (1 S, 4 S) - N -Boc-2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano-ditiocarbamato, lo que sugiere en estos casos que la hibridación de las moléculas favoreció al aumento de la actividad antiproliferativa. Así mismo el grupo metoxi presente en el compuesto SL-108, podría ser el causante del mejoramiento de la actividad anticancerígena, ya que hay reportes donde la sustitución por un grupo metoxi en diferentes

compuestos mejora notablemente las propiedades antiproliferativas (Garuti, et al, 2001; Garuti, et al, 2000; Li, et al, 2010; Lee, et al, 2003).

Con respecto a la actividad necrótica de los compuestos se ha encontrado un compuesto formado por el 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano y por el ditiocarbamato, el cual no induce una muerte necrótica en células CaSki, MDA-MB231 y SK-Lu-1 (Laskar, et al, 2017). Posteriormente se reportó la actividad necrótica de los derivados del SL-16 los cuales presentaron una actividad necrótica nula o baja (<10%) en células HeLa, CaSki y ViBo (Laskar, 2018). Lo anteriormente mencionado se correlaciona con los datos obtenidos en este trabajo en donde la actividad antiproliferativa del compuesto SL-108 en líneas de cáncer cérvico uterino, es de baja o nula actividad necrótica, sugiriendo así que los efectos colaterales generados por la actividad necrótica de los quimioterapéuticos clásicos, podrían ser menores o mejor tolerados por los pacientes.

Considerando los numerosos informes y publicaciones sobre la síntesis de agentes anticancerígenos, no hay medicamentos con 100% de eficacia en cánceres diseminados. Por lo tanto, todavía existe una demanda considerable de descubrimiento de fármacos que conducen a compuestos anticancerígenos eficientes con un nuevo andamiaje o mecanismo de acción específico para superar los problemas asociados con la quimioterapia actual en el tratamiento del cáncer, tales como la toxicidad y resistencia a los medicamentos (Gottesman, 2002). Entre las diferentes estrategias utilizadas para la quimioterapia, la inducción de la apoptosis o muerte celular programada en las células cancerosas es uno de los enfoques más requeridos para el tratamiento farmacológico, limitando la muerte concurrente de las células normales y permitiendo así el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos (Gerl & Vaux, 2005). La apoptosis dependiente de las caspasas es la más importante forma de muerte celular controlada en células normales y cancerosas. Se trata de la activación de una familia de proteasas de cisteína conocidas como caspasas, dentro de las cuales se encuentra la caspasa 3 que es la enzima clave para promover el camino hacia la apoptosis (Pop & Salvesen, 2009).

Con lo que respecta al proceso apoptótico los resultados han mostraron que el compuesto SL-108 induce un muerte apoptótica en células HeLa, CaSki y ViBo ya que se observó la compactación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de los cuerpos apoptóticos en los cultivos celulares, a su vez también se observó la presencia de la caspasa -3 activa con diferentes porcentajes, para HeLa 30.9%, CaSki 35.3% y ViBo 9.26 %, con lo que se confirmó que el compuesto SL-108 si induce una muerte apoptótica dependiente de caspasa-3, dichos resultados coinciden con lo reportado en la literatura para cada compuesto que lo conforma, en donde encontramos que los ditiocarbamatos son capaces de inducir apoptosis mediada principalmente por caspasas 3, 6 y 9 activadas por un vía intrínseca dependiente de p53 en donde se observó un aumento en las proteínas proapoptóticas y una disminución de las proteínas antiapoptóticas en células HeLa (Li, et al, 2015);

también encontramos que el derivado del  $\beta$ -nitroestireno, el CYT-Rx20 indujo apoptosis dependiente de caspasas 9 y 3 en células de cáncer de ovario y células de cáncer cérvico uterino a través de una vía de inducción de ROS y daño al ADN (Wang, et al, 2017) (Wang, Hsieh, et al, 2017) así mismo, otros derivados suprimen la vía de señalización TNF $\alpha$  / NF $\kappa$ B en un retinoide X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) de manera dependiente para inducir la apoptosis en células de cáncer de mama (Zeng, 2015). Por otro lado, los derivados de la piperazina han demostrado ser inductores de apoptosis dependientes de caspasas 8 y 3 mediante la inhibición de la vía PI3K/AKT (She & Hao, 2013). Complementario a esto se encontró que otro derivado desencadena la apoptosis activando caspasas 9 y 3 mediante una vía intrínseca en las células de leucemia U937 (Sampson, et al, 2011). También se ha reportado un compuesto basado en la molécula 2,5-diazabicyclo [2.2.1] heptano induce apoptosis a través de un proceso dependiente de caspasas en células CaSki (cáncer cérvico uterino), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y SK-LU-1 (cáncer de pulmón) (Laskar, et al, 2017). De igual manera, se consideró que el compuesto SL-16 (molécula inicial de donde derivó el SL-108) exhibió una actividad antiproliferativa induciendo a las células cancerosas de cuello uterino a una muerte por apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 (Laskar, 2018). Lo mencionado anteriormente y los resultados de este trabajo confirman que las moléculas conservaron su actividad apoptótica a pesar de la hibridación y las modificaciones estructurales que se realizaron sobre estas para dar lugar al compuesto SL-108, a su vez también la adición del grupo metoxi a la molécula híbrida pudo aumentar dicha actividad ya que se ha reportado en un estudio que los grupos metoxi en diferentes posiciones de un compuesto pueden ser cruciales para el efecto pro-apoptótico (Li, et al, 2010) (Roberti et al., 2003).

Los fármacos anticancerosos tratan a la enfermedad matando a las células que crecen rápidamente. Sin embargo, también hay células sanas y normales (como las sanguíneas, las del pelo, de piel y las del tubo digestivo) que crecen y se dividen rápidamente. Por ello, estas células sanas también pueden resultar dañadas por el tratamiento, y esa es la razón por la que la quimioterapia puede originar efectos secundarios (SEOM, 2018). Por tal motivo se buscan nuevos compuestos que tengan una actividad antiproliferativa y que a su vez tengan un efecto más selectivo, de forma que se afecten en lo menos posible las células sanas. La selectividad del compuesto no había sido probada por lo que es un punto relevante de nuestro trabajo.

En relación con el compuesto SL-108, solo se tienen datos de la molécula origen que es el compuesto SL-16 y del cual se reportó en la literatura que no afectó significativamente la proliferación de células linfocitarias a concentraciones de 0,31 y 0,42  $\mu$ g/ml. Sin embargo, en la concentración 1  $\mu$ g/mL, la proliferación de células linfocitarias está fuertemente inhibida. Por lo tanto, a una concentración de 1  $\mu$ g/mL podría tener un efecto inmunosupresor (Laskar, et al, 2018). En comparación con los datos obtenidos del compuesto SL-108 sobre los cultivos de linfocitos tratados con las IC<sub>50</sub> 1.5  $\mu$ g/ml, 2.2  $\mu$ g/ml y 2.4  $\mu$ g/ml no afectó significativamente la proliferación de las células no tumorales, además

de no inducir una muerte necrótica en estas células, donde las concentraciones son más altas en comparación con las del compuesto SL-16, el cual ejerce un fuerte efecto antiproliferativo, sugiriendo que el compuesto SL-108 actúa de manera selectiva. Estos resultados también indican que el grupo metoxi agregado al compuesto SL-108 en la posición 4 del anillo aromático es importante para atenuar la actividad antiproliferativa en células linfocíticas registrada en el SL-16.

Los resultados obtenidos en este trabajo son de importancia ya que se encontró que el compuesto SL-108 tiene propiedades antiproliferativas en células de cáncer cervical, con una baja o nula actividad citotóxica (necrosis) y con actividad inductora de muerte apoptótica, denotando una gran relevancia, ya que en la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos usados para el tratamiento contra el cáncer, dan origen a una fuerte actividad necrótica que en consecuencia provocan efectos secundarios graves, sugiriendo que dichos efectos secundarios generados por el compuesto SL-108 serían menores o más tolerables. Otro de los puntos relevantes es que el compuesto SL-108 mostró ser selectivo, que lo hace un compuesto prometedor para ser estudiado como un agente con potencial terapéutico contra el cáncer.

## 10. Conclusiones

- ∞ El compuesto SL-108 presenta actividad antiproliferativa en las células de cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo, con unas  $CI_{50}$  de 2.4, 2.8 y 1.5  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.
- ∞ Las concentraciones de  $IC_{50}$  del compuesto SL-108 en cada línea celular no promueven una actividad necrótica en los cultivos de células con cáncer cérvico uterino HeLa, CaSki y ViBo.
- ∞ El compuesto SL-108 a las concentraciones de 2.4, 2.8 y 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , induce muerte apoptótica en las células HeLa, CaSki y ViBo, dependiente de caspasa-3 activa.
- ∞ En cultivos de linfocitos el compuesto SL-108 no afecta el potencial proliferativo de los linfocitos tratados con 1.5, 2.4 y 2.8  $\mu\text{g/ml}$  ni genera una muerte necrótica.

## 11. Bibliografía

ACS. (2018). "Tratamiento del cáncer de cuello uterino". 21 de Agosto de 2018, de American Cancer Society Sitio web: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento.html>

ACS. (2018). "¿Cuáles son los factores de riesgo del cáncer de cuello uterino?" 25 de Diciembre del 2018, de American Cancer Society Sitio web: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>

AECC. (2018). "Causa del cáncer". 23 de diciembre del 2018, de Asociación Española Contra el Cáncer Sitio web: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/factores-riesgo>.

Aejaz, A., Molvi, K. I., Nazim, S., Baig, I., Memon, T., & Rahil, M. (2012). "The importance of six membered saturated nitrogen containing ring in psychological disorders". *J. Chem Pharm Res*, 4, 872-80.

Akkoc, M. K., Yuksel, M. Y., Durmaz, İ., & Atalay, R. Ç. (2012). "Design, synthesis, and biological evaluation of indole-based 1, 4-disubstituted piperazines as cytotoxic agents". *Turkish Journal of Chemistry*, 36(4), 515-525.

Alberts, B., & Bray, D. (2006). "Introducción a la biología celular". México: Ed. Médica Panamericana.

Altintop, M. D., Özdemir, A., Kaplancikli, Z. A., Turan-Zitouni, G., Temel, H. E., & Çiftçi, G. A. (2013). "Synthesis and biological evaluation of some pyrazoline derivatives bearing a dithiocarbamate moiety as new cholinesterase inhibitors". *Archiv der Pharmazie*, 346(3), 189-199.

Anand, N., & Sharma, S. (1997). "Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs". Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2013). "Biología: la vida en la tierra, con fisiología". México: Pearson Educación.

Ávila, M. O., Vega, A. F., & Alcázar, J. A. S. (2015). "Vida tras la muerte celular". *Investigación y ciencia.*, 462, 50-56.

Baltazar, R. L. M., Anaya, V. A., Andrade, S. M., Monroy, G. E. A., Bautista, L. J. R., Jonguitud, O. G., & Ramirez, F. M. (2008). "Polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter is associated with cervical neoplasm risk in Mexican women". *Biochemical genetics*, 46(3-4), 137-144.

Billard, W., & Peets, E. (1974). "Sulfhydryl Reactivity: Mechanism of Action of Several Antiviral Compounds Selenocystine, 4-(2-Propinyloxy)- $\beta$ -Nitrostyrene, and Acetylaranotin". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 5(1), 19-24.

Bosch, F. X., & De Sanjosé, S. (2003). "Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality". *JNCI Monographs*, 2003(31), 3-13.

Buenrostro, B. A. O., Pamplona, V. Á. Z., Maldonado, I. G. E., Hernández, A. R., & Enciso, I. D. (2011). "El cáncer cérvico-uterino: Implicaciones de la edad de inicio de vida sexual y el Papilomavirus humano". *Revista Fuente Año*, 3(8), 34-38

Carter, K. C., Finnon, Y. S., Daeid, N. N., Robson, D. C., & Waddell, R. (2002). "The effect of nitrostyrene on cell proliferation and macrophage immune responses". *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 24(2), 187-197.

Cascales, M. (2003). "Bases moleculares de la apoptosis". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 69 (1), 36-64.

Chen, I. H., Chang, F. R., Wu, Y. C., Kung, P. H., & Wu, C. C. (2015). "3, 4-Methylenedioxy- $\beta$ -nitrostyrene inhibits adhesion and migration of human triple-negative breast cancer cells by suppressing  $\beta$ 1 integrin function and surface protein disulfide isomerase". *Biochimie*, 110, 81-92.

Chipuk, J. E., Bouchier, H. L., & Green, D. R. (2006). "Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario". *Cell death and differentiation*, 13(8), 1396-1402.

Cooper G. y Hausman R. (2009). "The Cell: A Molecular Approach" (5ª Ed.) Estados Unidos: Sinauer Associates Inc.

Craig, B. T. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease". *Science*, 267(10), 1456-1462.

Cruz, G. L., & Diego, O. D. J. B. (2005). "Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 31(1), 1-8.

CSC. (2014). "Treatments & Side Effects". 21 de Agosto del 2018, de Cancer Support Community Sitio web: [https://www.cancersupportcommunity.org/sites/default/files/uploads/living-with-cancer/topics/booklet/fsac\\_treatments\\_and\\_side\\_effects.pdf?v=1](https://www.cancersupportcommunity.org/sites/default/files/uploads/living-with-cancer/topics/booklet/fsac_treatments_and_side_effects.pdf?v=1)

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). "Cell death: critical control points". *Cell*, 116(2), 205-219.

De la Garza, S.J. & Juárez, S.P. (2014). "El cáncer". Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Decker, M. (2011). "Hybrid molecules incorporating natural products: applications in cancer therapy, neurodegenerative disorders and beyond". *Current Medicinal Chemistry*, 18(10), 1464-1475.

Di Bonito, P., Grasso, F., Mochi, S., Accardi, L., Donà, M. G., Branca, M., & Syrjänen, K. (2006). "Serum antibody response to Human papillomavirus (HPV) infections detected by a novel ELISA technique based on denatured recombinant HPV16 L1, L2, E4, E6 and E7 proteins". *Infectious agents and cancer*, 1(1), 1-9.

Dua, R., Shrivastava, S., Sonwane, S. K., & Srivastava, S. K. (2011). "Pharmacological significance of synthetic heterocycles scaffold: a review". *Advances in Biological Research*, 5(3), 120-144.

Dunan, C., Liam, K., Cala, C., Infante, T., Nadia, I., & Hernandez, L. (2011). "Gynecobstetric risk factors for cervical cancer in primary health care". *Medisan*, 15(5), 573-579.

El Sayed, H., Amer, M. R., Abdalla, O. M., Aly, A. A., Soomro, S., Jabeen, A., & Ul-Haq, Z. (2012). "Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of benzyl, alkyl and glycosyl [2-(arylamino)-4, 4-dimethyl-6-oxo-cyclohex-1-ene] carbodithioates, as potential immunomodulatory and immunosuppressive agents". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(9), 3000-3008.

Frontela, N. M., Marin, Y. R., Ríos, H. M. D. L. Á., & Hernández, M. M. (2014). "Infección por *Chlamydia trachomatis* como cofactor en la etiología del cáncer cervical". *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 40(1), 68-78.

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P. & Kroemer, G. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018". *Cell Death & Differentiation*, 25, 486-541.

Gan, L. L., Fang, B., & Zhou, C. H. (2011). "Synthesis of Azole-Containing Piperazine Derivatives and Evaluation of Their Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities". *ChemInform*, 31(12), 3684-3692

Garuti, L., Roberti, M., Malagoli, M., Rossi, T., & Castelli, M. (2000). "Synthesis and antiproliferative activity of some benzimidazole-4, 7-dione derivatives". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10(19), 2193-2195.

Garuti, L., Roberti, M., Pession, A., Leoncini, E., & Hrelia, S. (2001). "Synthesis and antiproliferative activity of some thiazolylbenzimidazole-4, 7-diones". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(24), 3147-3149.

Gaspari, P., Banerjee, T., Malachowski, W. P., Muller, A. J., Prendergast, G. C., DuHadaway, J., Bennett, S. & Donovan, A. M. (2006). "Structure-Activity Study of Brassinin Derivatives as Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Inhibitors". *Journal of medicinal chemistry*. 49(2), 684-692.

Gerhäuser, C., You, M., Liu, J., Moriarty, R. M., Hawthorne, M., Mehta, R. G. & Pezzuto, J. M. (1997). "Cáncer chemopreventive potential of sulforamate, a novel analogue of sulforaphane that induces phase 2 drug-metabolizing enzymes". *Cancer Research*, 57(2), 272-278.

Gerl, R., & Vaux, D. L. (2005). "Apoptosis in the development and treatment of cancer". *Carcinogenesis*, 26(2), 263-270.

GLOBOCAN (2018). "Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer". 4 de Enero del 2019, de Global Cancer Observatory. Sitio web: <https://gco.iarc.fr/>

Gottesman, M. M. (2002). "Mechanisms of cancer drug resistance". *Annual review of medicine*, 53(1), 615-627.

Hamblett, C. L., Methot, J. L., Mampreian, D. M., Sloman, D. L., Stanton, M. G., Kral, A. M. & Hitz, A. M. (2007). "The discovery of 6-amino nicotinamides as potent and selective histone deacetylase inhibitors". *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(19), 5300-5309.

He, X. Y., Lu, L., Qiu, J., Zou, P., Yu, F., Jiang, X. K. & Xie, L. (2013). "Small molecule fusion inhibitors: Design, synthesis and biological evaluation of (Z)-3-(5-(3-benzyl-4-oxo-2-thioxothiazolidinylidene) methyl)-N-(3-carboxy-4-hydroxy) phenyl-2, 5-dimethylpyrroles and related derivatives targeting HIV-1 gp41". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(23), 7539-7548.

Hernández, J. A. S., Pineda, M. I. H., Tapia, J. A. R., & Pérez, M. R. (2005). "Infección por VPH y cáncer cérvico uterino". *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 52(4), 222-233.

Hidalgo, V. S., López, G. M., Chillón, M.R., Rodríguez, S. L., Ochoa, G. O., Cachán, F. R., Pérez, P. R.J., Pérez, R. A., Durán, G. V. & Belén del Río, S. M. (2017). "Fisioterapeutas. Servicio Andaluz de Salud (SAS)". España: Ediciones Rodio.

Hung, A. C., Tsai, C. H., Hou, M. F., Chang, W. L., Wang, C. H., Lee, Y. C. & Yuan, S. S. F. (2016). "The synthetic  $\beta$ -nitrostyrene derivative CYT-Rx20 induces breast cancer cell death and autophagy via ROS-mediated MEK/ERK pathway". *Cancer letters*, 371(2), 251-261.

Iracheta, M. L. (2007). "El suicidio y la muerte celular". *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 101(2), 1-33

Jain, V. K., Jain, B., Sharma, U. K., & Saha, D. I. B. Y. A. J. Y. O. T. I. (2011). "Synthesis, characterization and antimicrobial screening of some 4-substituted-1-(4-substituted phenyl) piperazine derivatives". *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(1), 66-70.

Jordán, J. (2003). "Apoptosis: muerte celular programada". *Offarm*, 22(6), 100-106.

Joshi, N. K., Kundariya, D.S & Parmar. (2012). "Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of some novel 1, 3, 4-oxadiazoles containing piperazine moiety". *International Journal ChemTech Research*. 24, 1503-1508

Kamal, A., Sathish, M., Nayak, V. L., Srinivasulu, V., Kavitha, B., Tangella, Y. & Nagesh, N. (2015). "Design and synthesis of dithiocarbamate linked  $\beta$ -carboline derivatives: DNA topoisomerase II inhibition with DNA binding and apoptosis inducing ability". *Bioorganic & medicinal chemistry*, 23(17), 5511-5526.

Karali, N., Apak, I., Özkirimli, S., Gürsoy, A., Dogan, S. U., Eraslan, A., & Özdemir, O. (1999). "Synthesis and pharmacology of new dithiocarbamic acid esters derived from phenothiazine and diphenylamine". *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 332(12), 422-426.

Kroemer, G. (1999). "Mitochondrial control of apoptosis: an overview". In *Biochem Soc Symp*. 66(32), 1-8.

Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). "Caspases and kinases in a death grip". *Cell*, 138(5), 838-854.

Laskar, S., Sánchez, S. L., Flores, S. M., López, M. H., Escobar, S. M. L., López, O. M., & Regla, I. (2018). "Identification of (1S, 4S)-2, 5-diazabicyclo [2.2. 1] heptane-dithiocarbamate-nitrostyrene hybrid as potent antiproliferative and apoptotic inducing agent against cervical cancer cell lines". *European journal of medicinal chemistry*, 146, 621-635.

Laskar, S., Sánchez, S. L., López, O. M., López, M. H., Escobar, S. M. L., Sánchez, A. T., & Regla, I. (2017). "Multicomponent synthesis of some new (1 S, 4 S)-2, 5-diazabicyclo [2.2. 1] heptane-dithiocarbamates and their in vitro anti-proliferative activity against CaSki, MDA-MB-231 and SK-Lu-1 tumour cells as apoptosis inducing agents without necrosis". *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 32(1), 1129-1135.

Lee, S. K., Nam, K. A., Hoe, Y. H., Min, H. Y., Kim, E. Y., Ko, H., & Kim, S. (2003). "Synthesis and evaluation of cytotoxicity of stilbene analogues". *Archives of pharmacal research*, 26(4), 253-257.

Li, H., Wu, W. K., Li, Z. J., Chan, K. M., Wong, C. C., Ye, C. G., Yu, L., Sung, J. J., Cho, C. H., Wang, M. (2010). "2,3',4,4',5'-Pentamethoxy-trans-stilbene, a resveratrol derivative, inhibits colitis-associated colorectal carcinogenesis in mice". *British journal of pharmacology*, 160(6), 1352-61.

Li, Y., Qi, H., Li, X., Hou, X., Lu, X., & Xiao, X. (2015). "A novel dithiocarbamate derivative induces cell apoptosis through p53-dependent intrinsic pathway and suppresses the expression of the E6 oncogene of human papillomavirus 18 in HeLa cells". *Apoptosis*, 20(6), 787-795.

Lin, K., Doolan, K., Hung, C. F., & Wu, T. C. (2010). "Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines". *Journal of the Formosan Medical Association*, 109(1), 4-24.

Lodish, H., Berk, A., Chris, A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., & Matthew, P. S. (2015). "Biología celular y molecular". Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Machado, J. P., & Concepción, A. E. L. (2012). "Apoptosis, mecanismo de acción". *Medimay*, 18(2), 138-153.

Maioral, M. F., Nascimento, B. C., Stefanos, N. M., Bigolin, Á., Mascarello, A., Chiaradia, D. L. D., & Santos-Silva, M. C. (2017). "Cytotoxic effect of a novel naphthylchalcone against multiple cancer cells focusing on hematologic malignancies". *Biochimie*, 140, 48-57.

Mao, Z., Zheng, X., Qi, Y., Zhang, M., Huang, Y., Wan, C., & Rao, G. (2016). "Synthesis and biological evaluation of novel hybrid compounds between chalcone and piperazine as potential antitumor agents". *RSC Advances*, 6(10), 7723-7727.

Meher, C. P., Rao, A. M., & Omar, M. (2013). "Piperazine-pyrazine and their multiple biological activities". *Asian J. Pharm. Sci. Res*, 3(4), 43-60.

Melgar, F. R., González, O. R., Olivares, R. J. L., González, L. V., Romero, P. L., Del Refugio R. Z. M., & Juaristi, E. (2008). "Synthesis of Novel Derivatives of (1S, 4S) -2, 5-Diazabicyclo [2.2. 1] heptane and Their Evaluation as Potential Ligands in Asymmetric Catalysis". *European Journal of Organic Chemistry*, 2008(4), 655-672.

Miranda, B. Y., Puerto, G. C. E., Roa, L. V. C., Tangarife, C. V., Kouznetsov, V. V., & Betancur, G. L. (2014). "Evaluación de la actividad biológica in vitro de diversos híbridos basados en el radical 3, 4, 5-trimetoxifenil de la combretastatina A-4". *Vitae*, 21(1), S53-S54

Mukherjee, D. E. B. K. I. R. O. N., Mukhopadhyay, A., Bhat, K. S., Shridhara, A. M., & Rao, K. S. (2014). "Synthesis, characterization and anticonvulsant activity of substituted 4-chloro-2-(4-piperazin-1-yl) quinazolines". *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 6(5), 567-571.

Muñoz, A. (2004). "Cáncer: genes y nuevas terapias". España: Editorial Hélice.

Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V. & Meijer, C. J. (2003). "Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer". *New England Journal of Medicine*, 348(6), 518-527.

Murineddu, G., Asproni, B., Pinna, G., Curzu, M. M., Dore, A., Pau, A., & Pinna, G. A. (2012). "Synthesis of biologically active bridged diazabicycloheptanes". *Current medicinal chemistry*, 19(31), 5342-5363.

NIH. (2018). "Tratamiento del cáncer de cuello uterino". 21 de Agosto del 2018, de Instituto Nacional del Cáncer Sitio web: [https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/paciente/tratamiento-cuello-uterino-pdq#section/\\_61](https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cuello-uterino/paciente/tratamiento-cuello-uterino-pdq#section/_61)

Pop, C., & Salvesen, G. S. (2009). "Human caspases: activation, specificity, and regulation". *Journal of Biological Chemistry*, 284(33), 21777-21781.

Prado, M. D. C. A., Fernández, L. L., Román, T. D., & García, M. E. F. (1997). "La apoptosis: sus características y su papel en la transformación maligna de la célula". *Revista Cubana de Oncología*, 13(2), 126-134.

Puentes, N. L. (2016). "Niveles de actividad enzimática de lactato deshidrogenasa en pacientes con cáncer bucal". *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 20(6), 683-689.

Quezada, M.A. (2007). "El ciclo celular, sus alteraciones en el cáncer y como es regulado en células troncales embrionarias". *Contacto S*, 65, 5-12.

Rahmani, N. S., Safavi, M., Pordeli, M., Ardestani, S. K., Khosravani, L., Pourshojaei, Y., & Shafiee, A. (2014). "Synthesis, in vitro cytotoxicity and apoptosis inducing study of 2-aryl-3-nitro-2H-chromene derivatives as potent anti-breast cancer agents". *European journal of medicinal chemistry*, 86, 562-569.

Roberti, M., Pizzirani, D., Simoni, D., Rondanin, R., Baruchello, R., Bonora, C., & Tolomeo, M. (2003). "Synthesis and biological evaluation of resveratrol and analogues as apoptosis-inducing agents". *Journal of medicinal chemistry*, 46(16), 3546-3554.

Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). "Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación". *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*, 4(3), 92-106.

Rossi, R., Giustarini, D., Dalle, D. I., & Milzani, A. (2006). "Protein S-glutathionylation and platelet anti-aggregating activity of disulfiram". *Biochemical pharmacology*, 72(5), 608-615.

Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L., & Girotti, R. (2003). "Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors". *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(5), 2252-2259.

Saavedra, L. & Soberón, L. (2006). "Cáncer cérvico uterino y el virus del papiloma humano: La historia que no termina". *Cancerología*, 1(1), 31-55.

Sampson III, J. J., Donkor, I. O., Huang, T. L., & Adunyah, S. E. (2011). "Novel piperazine induces apoptosis in U937 cells". *International journal of biochemistry and molecular biology*, 2(1), 78-88.

Sanabria, N. J. G. (2009). "Virus del Papiloma humano". *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 13(4), 168-187.

Sánchez, S. V. (2001). "Mecanismos reguladores de la muerte celular no necrótica". *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 20(4), 266-274.

SEOM. (2008). "Efectos secundarios de la quimioterapia". 5 de enero del 2018, de Sociedad Española de Oncología Médica Sitio web: <https://www.pfizer.es/docs/pdf/salud/Oncovida13.pdf>

Serrano, R. O., Pérez, C. J. U., Martínez, L. A. D., & Romero, Y. R. D. (2004). "Factores de riesgo para cáncer de cuello uterino". *Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*, 55(2), 146-160.

She, E. X., & Hao, Z. (2013). "A novel piperazine derivative potently induces caspase-dependent apoptosis of cancer cells via inhibition of multiple cancer signaling pathways". *American journal of translational research*, 5(6), 622-633.

Shi, X., Leonard, S. S., Wang, S., & Ding, M. (2000). "Antioxidant properties of pyrrolidine dithiocarbamate and its protection against Cr (VI)-induced DNA strand breakage". *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 30(2), 209-216.

SS. (2015). "Estadísticas de Cáncer de Mama y Cáncer Cérvico Uterino". 15 de Octubre del 2017, de Secretaría de Salud Sitio web: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica>.

Stanley, M. A., Pett, M. R. & Coleman, N. (2007). "HPV: from infection to cancer". *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1456-1460.

Torres, L. E. S., & Vargas, F. D. (2003). "Apoptosis: el fenómeno y su determinación". *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 41(1), 49-62.

Vásquez, C. R. (2018). "Biología 1". México: Grupo Editorial Patria.

Von Knebel, D. M., Spitkovsky, D., & Ridder, R. (1997). "Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer". *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 81, 233-239.

Wang, Y. Y., Chen, Y. K., Hu, S. C. S., Hsu, Y. L., Tsai, C. H., Chi, T. C., & Yuan, S. S. F. (2017). "CYT-Rx20 inhibits ovarian cancer cells in vitro and in vivo through oxidative stress-induced DNA damage and cell apoptosis". *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 79(6), 1129-1140.

Wang, Y. Y., Hsieh, P. W., Chen, Y. K., Hu, S. C. S., Hsu, Y. L., Tsai, C. H., & Yuan, S. S. F. (2017). "CYT-Rx20 Inhibits Cervical Cancer Cell Growth and Migration Through Oxidative Stress-Induced DNA Damage, Cell Apoptosis, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition Inhibition". *International Journal of Gynecological Cancer*, 27(7), 1306-1317.

Willingham, A. T., Deveraux, Q. L., Hampton, G. M., & Aza-Blanc, P. (2004). "RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function". *Oncogene*, 23(51), 8392-8400.

Zeng, Z., Sun, Z., Huang, M., Zhang, W., Liu, J., Chen, L., Chen, F., Zhou, Y., Lin, J., Huang, F., Xu, L., Zhuang, Z., Guo, S., Alitongbieke, G., Xie, G., Xu, Y., Lin, B., Cao, X., Su, Y., Zhang, X. K., & Zhou, H. (2015) "Nitrostyrene derivatives act as RXR $\alpha$  ligands to inhibit TNF $\alpha$  activation of NF- $\kappa$ B". *Cancer Research* 75(10), 2049–2060.

Zheng, Y. C., Duan, Y. C., Ma, J. L., Xu, R. M., Zi, X., Lv, W. L., & Zhu, Y. Y. (2013). "Triazole–dithiocarbamate based selective lysine specific demethylase 1 (LSD1) inactivators inhibit gastric cancer cell growth, invasion, and migration". *Journal of medicinal chemistry*, 56(21), 8543-8560.

## 12. Anexos

### Preparación de reactivos

#### ◆ Medio de cultivo RPMI-1640

RPMI-1640 (Laboratorios Microlab)	10.42g
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, E.U.A)	2 g

Una vez pesados los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH a 7.2 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza por medio de filtrado en vacío a través de una membrana con poro de 0.47mm, se almacena a 4°C. El medio de cultivo se complementa con 5% de suero de ternera neonatal (SNT), en la porción requerida y posteriormente es nuevamente filtrada.

#### ◆ Desactivación del suero

Para poder adicionar el SNT al medio RPMI-1640, previamente el suero se debe desactivar, para ello se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelados, posteriormente se colocan en baño maría a 56°C durante 30 min. Una vez desactivado se alícuota en tubos cónicos de plástico estériles de 50ml.

#### ◆ Verseno

Se utiliza para despegar las células del cultivo, en este caso se usaron para despegar HeLa y CaSki, su función es actuar como un agente quelante que secuestra a los iones de calcio y magnesio de las uniones celulares. Para su preparación se utilizan los siguientes reactivos:

Ácido Etilén Diamino Tetra Acético EDTA (Sigma, USA)	0.4g
Cloruro de Sodio NaCl (Sigma, USA)	8g
Cloruro de potasio KCl (Sigma, USA)	0.4g
Tris (Sigma, USA)	3.04g

Los reactivos se disuelven en 800ml de agua bidestilada. Se ajusta el pH de la solución a 7.7 con HCl 1N y se afora a 1000ml de agua bidestilada. La solución se esteriliza a una presión de 1.20 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 min y se almacena a 4°C.

### ◆ **Tripsina**

Esta solución se usó para despegar a las células ViBo del cultivo celular, su función se basa en romper los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. Se prepara al 0.5% en verseno e condiciones estériles.

### ◆ **Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)**

Esta solución fue empleada para lavar las células ya que mantienen las condiciones fisiológicas estables por un corto tiempo esto se debe a su capacidad amortiguante. Para su preparación se necesitan los siguientes reactivos:

Fosfato diácido de potasio $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Sigma- Aldrich, USA)	0.20g
Fosfato monoácido de sodio $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (Sigma-aldrich, USA)	2.16g
Cloruro de sodio $\text{NaCl}$ (Sigma-Aldrich, USA)	8.0g
Cloruro de potasio $\text{KCl}$ (Sigma-Aldrich, USA)	0.20g

Los reactivos se disuelven en 800 ml de agua bidestilada. A esta solución se le ajusta el pH a 7.2 utilizando HCl 1N, posteriormente se afora a 1000ml. Finalmente se esteriliza por medio de filtración con una membrana de 22  $\mu\text{m}$  y se almacena a 4°C.

### ◆ **Glutaraldehído**

Esta solución fue usada para la fijación de las células para preservar la estructura celular ya que es capaz de formar puentes entre moléculas de los tejidos. En solución polimeriza formado dímeros y trímeros. Se prepara de la siguiente manera diluyendo 1.57 ml de glutaraldehído (70% v/v) en 98.43 ml de agua bidestilada y se almacena a 4°C.

### ◆ **Fijador de células para microscopia de epifluorescencia**

Este fijador se usó para fijar la células a las placas de cultivo y permitir a su vez que se permeabilicen con tritón X-100 para la posterior incorporación de los anticuerpos y fluorocromos dentro de la célula. Para su preparación se necesitan:

Paraformaldehído al 4%	0.8g
Glutaraldehído al 2.5%	0.8 ml

Calentar en baño maría a 60°C 20 ml de PBS y agregar los 0.8 g de paraformaldehído, una vez disuelto, la solución se pasa a hielo para que se enfríe y posteriormente se agregan 0.8ml de

glutaraldehído y se mezclan, se alicuotan en tubos cónicos de plástico de 15 ml y se refrigeran a 4°C.

◆ **Solución de cristal violeta (0.1%)**

Este reactivo se usó para la tinción de las células y poder definir el número celular. Para su preparación se necesita:

Hidróxido de sodio NaOH (Sigma-Aldrich, E.U.A)	3.96 g
Ácido Fórmico (Sigma-Aldrich, E.U.A)	4.28 g
Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, E.U.A)	1.0 g

Se preparan 500 ml de cristal violeta a una concentración de 0.1%. Se requiere previamente preparar una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 mM con un pH de 6. Posteriormente se adiciona el cristal violeta, se diluye y se filtra usando papel filtro. Se almacena a temperatura ambiente.

◆ **Solución de ácido acético (10%)**

A 10 mL de ácido acético (J. T. Baker) se le agregan 90 ml de agua bidestilada.

◆ **Camptotecina**

Se usó este fármaco como control positivo de muerte celular apoptótica, ya que se conoce que activa la vía intrínseca de la apoptosis. Se preparación consiste en pesar 5mg de camptotecina y disolverlos en un 1ml de DMSO. Una vez disuelto se realizan alícuotas de 50ml en tubos eppendorf de 0.5 ml estériles y se almacena a temperatura ambiente.