



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“Caracterización del mecanismo molecular asociado con la citotoxicidad de los compuestos híbridos JPINAPP09 y JPINAPP18 en líneas celulares neoplásicas”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ARIANA ROMERO VELASQUEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ignacio González Sánchez
Facultad de Química, UNAM

COTUTOR DE TESIS: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Facultad de Química, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez
Facultad de Química, UNAM

CD. MX.

ENERO

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

OFICIO CPCB/1209/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión virtual del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 08 de noviembre de 2021 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EXPERIMENTAL** de la estudiante **ROMERO VELÁSQUEZ ARIANA** con número de cuenta **308147207** con la tesis titulada **CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR ASOCIADO CON LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS HÍBRIDOS JPINAPP09 y JPINAPP18 EN LÍNEAS CELULARES NEOPLÁSICAS**, realizada bajo la dirección del **DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente(a): DRA. MARCELA LIZANO
SOBERÓN Vocal: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI
Vocal: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALA
Vocal: DRA. SILVIA LAURA GUZMÁN GUTIÉRREZ
Secretario(a): DR. EDGAR RICARDO VÁZQUEZ
MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL
ESPIRITU”

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de diciembre de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos Institucionales

Al posgrado en ciencias biológicas UNAM, por su honrada labor de producir conocimiento en beneficio de nuestra nación

A CONACYT por el apoyo económico recibido para la realización de este proyecto
(CVU 915731)

A mi tutor Dr. Ignacio González Sánchez y a los miembros del comité tutorial, Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez por sus valiosas observaciones y aportaciones a este proyecto

A los apreciables integrantes del jurado por el empeño y confianza brindados

Un soneto

“El material de una noche florea.
Estoy luminosamente escondido.
Tiene el jazmín de Arabia tanto fluido
que así es la perfección que redondea.

Algo que nace, como que aletea.
Un átomo de vida se ha encendido,
y el universo ejerce su tarea.
¿Dónde estará la fuente del olvido?

En el incendio inútil de una rosa
pereci6 perseguida mariposa.
La noche puso en pie nombres callados.

Todos los sueños estaban despiertos;
y la vida con los ojos cerrados
y la muerte con los ojos abiertos.”

(Carlos Pellicer)

Lomas de Chapultepec,
4 de octubre de 1976

Dedicatoria

A las identidades neurodivergentes, en especial aquellas que día con día tienen que lidiar con ansiedad o depresión

A quienes a pesar de sus enfermedades encuentran el valor de levantarse y crear cosas desde el corazón

A quienes, a causa de cualquier trastorno emocional o mental, no son capaces de levantarse todavía

A quienes se despidieron a causa de las luchas interiores de la mente, el corazón y el alma, y ya no fueron capaces de levantarse nunca más

Agradecimientos personales

Agradezco a mi madre, Martha Velázquez, y a mi familia por sostenerme y respaldarme en mis etapas más oscuras. Por llenarme de amor incondicional y guiarme a través de lo correcto y lo justo.

A Karol Almeida por ser como un hogar en el que puedo hallar refugio, siento que las palabras no me hacen justicia para expresarte toda la gratitud que siento hacia ti.

A mi especial grupo de amigas, por acompañarme en el bello arte de hacer ciencia en conjunto. Anaiza, te agradezco por compartir tu sabiduría conmigo. Alejandra, te agradezco por empatizar con mis sentimientos y llenarme de fuerza. Mariana, agradezco lo bello que es tu corazón y tu sinceridad. Natalia, te agradezco por compartir tu elevado sentido estético, por tu ternura y sabiduría.

A Mariana Meza por todas esas tardes en las que los consejos y apoyos se convirtieron en profundos lazos de unión y cariño.

A los integrantes del laboratorio 323 de endocrinología molecular por hacerme sentir como en casa.

A Javier Lefilaf por todo el amor que me brindas, las canciones que me compartes y la poesía que me recitas.

A Lilián Cervantes por todos estos años de amistad que han persistido aún en los momentos más oscuros.

A Renata Moreno por llenarme las noches de paz, las ideas de sueños y el pecho de rebeldía.

A Marco Garduño por llenarme de ternura, calidez y comprensión.

A Helio por su compañía incondicional y toda esa paz que surge en mi corazón cuando estamos juntos.

ÍNDICE TEMÁTICO

	ABREVIATURAS	1
	RESUMEN	2
1	INTRODUCCIÓN	4
2	ANTECEDENTES	5
	2.1 CÁNCER	5
	2.1.1 Definición e incidencia del cáncer	5
	2.1.2 Desarrollo (carcinogénesis)	5
	2.1.3 Tratamiento del cáncer	7
	2.2 MICROTÚBULOS	9
	2.2.1 Equilibrio dinámico de los microtúbulos	12
	2.3 DESCRIPCIÓN DE AGENTES QUÍMICOS QUE SE UNEN A LA TUBULINA	14
	2.4 ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE LA COMBRETASTATINA A-4	17
3	JUSTIFICACIÓN	20
4	HIPÓTESIS	21
5	OBJETIVOS	21
6	MÉTODOS	22
	6.1 Cultivo celular	22
	6.2 Análisis de la citotoxicidad en líneas celulares	22
	6.3 Estudios de polimerización <i>in vitro</i> de la tubulina	23
	6.4 Evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo	23
	6.5 Determinación de la fragmentación del ADN en células HeLa	24
	6.6 Análisis por <i>Western blot</i> de la proteína caspasa-3	25
7	RESULTADOS	26
	7.1 Análisis de la citotoxicidad en líneas celulares	26
	7.2 Estudios de polimerización <i>in vitro</i> de la tubulina	27
	7.3 Evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo	29
	7.4 Determinación de la fragmentación del ADN en células HeLa	31
	7.5 Análisis por <i>Western blot</i> de la proteína caspasa-3	33
8	DISCUSIÓN	34
9	CONCLUSIONES	39
10	PERSPECTIVAS	39
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los compuestos precursores (DBEC04 y CA-4) y los híbridos (JPINAPP09 y JPINAPP18) que presentan actividad citotóxica en células HeLa.	4
Figura 2. Estructura de los microtúbulos	10
Figura 3. Esquema del heterodímero α/β de la tubulina	11
Figura 4. Equilibrio dinámico de los microtúbulos	13
Figura 5. Clasificación de los MTAs de acuerdo con su mecanismo de acción	15
Figura 6. Regulación del escape mitótico (<i>mitotic slippage</i>) en células tratadas con agentes de unión a los microtúbulos	16
Figura 7. Sitio de unión de la colchicina en la interfaz entre las subunidades α y β de la tubulina	18
Figura 8. Acoplamiento molecular de las moléculas precursoras y los híbridos moleculares en el sitio de unión de la colchicina	19
Figura 9. Citotoxicidad de los compuestos híbridos en células HeLa	27
Figura 10. Efecto sobre la polimerización de los microtúbulos	28
Figura 11. Alteraciones en el ciclo celular de células HeLa	30
Figura 12. Condensación de la cromatina y corte de ADN	32
Figura 13. Los compuestos híbridos inducen la activación de caspasa-3	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer.	8
Tabla 2. Citotoxicidad de moléculas precursoras (DEBC04 y CA-4) en líneas celulares tumorales.	19
Tabla 3. Actividad citotóxica de los híbridos análogos a viiiombretastatina A-4 (CA-4) en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa), pulmonar (SK-LU-1) y de leucemia (K-562)	26

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC/C	Siglas de <i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i>
CA-4	Combretastatina A-4
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
EDTA	Ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	Ácido etilen glicol tetra acético
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
D.E.	Desviación estándar
DMEM	Siglas de <i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
GTP	Guanosín trifosfato
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
MTA	Siglas de <i>microtubule targeted agents</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
PFA	P-formaldehído
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SAC	Siglas de <i>spindle assembly checkpoint</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TUNEL	Siglas de <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
V _{max}	Velocidad máxima

RESUMEN

Los agentes de unión a la tubulina son un conjunto de compuestos con un gran potencial terapéutico contra el cáncer debido a los efectos que producen durante la división celular y la mitosis.

Entre los fármacos que se unen a los microtúbulos y que han sido aprobados para uso clínico se pueden citar al paclitaxel y la vinblastina, los cuales presentan un mecanismo de acción mediado por su unión a los dímeros de α/β -tubulina. En particular, el fármaco combretastatina A-4 (CA-4) y sus derivados, comparten el sitio de unión de la colchicina en los microtúbulos y desencadenan un efecto citotóxico considerable.

En la búsqueda de tratamientos selectivos, eficaces y seguros para el cáncer se siguen diversas rutas de síntesis química, entre ellas podemos mencionar a la hibridación molecular, la cual consiste en la fusión estructural de dos regiones farmacofóricas para la obtención de un nuevo compuesto con características híbridas.

En el presente proyecto de tesis se realizó la evaluación de la actividad citotóxica de un par de compuestos híbridos análogos a CA-4. Se espera que la actividad citotóxica de los compuestos JPINAPP09 y JPINAPP18 esté principalmente relacionada con su unión a los microtúbulos, induciendo alteraciones en la estructura y funcionalidad de la tubulina.

En los ensayos de viabilidad celular con MTT se encontró que los híbridos ejercen un efecto citotóxico notorio, en el estudio de polimerización *in vitro* de la tubulina se confirmó la capacidad de los compuestos híbridos de inhibir la polimerización de los microtúbulos, interfiriendo con el ensamblaje de la tubulina y ocasionando arresto del ciclo celular, el cual fue examinado mediante ensayos de citometría de flujo con yoduro de propidio. Mediante ensayos de TUNEL y *Western blot* de la proteína caspasa-3 se confirmó que los compuestos híbridos inducen muerte celular de tipo apoptótica.

Finalmente, en este trabajo se pudo confirmar que los compuestos híbridos inhiben la polimerización de los microtúbulos. Como resultado de la alteración en la tubulina se

produce arresto del ciclo celular, mismo que al no ser resuelto, desencadena mecanismos de muerte celular dependientes de caspasas.

ABSTRACT

Tubulin-binding agents are a set of compounds with great therapeutic potential against cancer due to the effects they produce during cell division and mitosis.

Among the drugs that bind to microtubules and have been approved for clinical use are included paclitaxel and vinblastine, both of which have a mechanism of action mediated by binding to α/β -tubulin dimers. In particular, the drug combretastatin A-4 (CA-4) and its derivatives share the colchicine binding site on microtubules and trigger a considerable cytotoxic effect.

In the search for selective, effective and safe treatments for cancer, several chemical synthesis routes are followed, among them we can mention molecular hybridization, which consists of the structural fusion of two pharmacophoric regions to obtain a new compound with hybrid characteristics.

In the present thesis project, the evaluation of the cytotoxic activity of a pair of hybrid compounds analogous to CA-4 was performed. The cytotoxic activity of the compounds JPINAPP09 and JPINAPP18 is expected to be mainly related to their binding to microtubules, causing alterations in tubulin structure and functionality.

In cell viability assays with MTT it was found that the hybrids exert a notorious cytotoxic effect, in the in vitro tubulin polymerization study it was confirmed the capacity of the hybrid compounds to inhibit the microtubule polymerization, interfering with tubulin assembly and causing cell cycle arrest, which was examined by flow cytometry assays with propidium iodide. TUNEL and Western blot assays of caspase-3 protein confirmed that the hybrid compounds induced apoptotic cell death.

Finally, this work confirmed that the hybrid compounds inhibit the polymerization of microtubules. As a result of the alteration in tubulin, cell cycle arrest occurs, which, when not resolved, triggers caspase-dependent cell death mechanisms.

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se trata de la segunda causa de muerte en el mundo y tan sólo en el año 2018 ocasionó 9.6 millones de defunciones.¹

Tomando en consideración el problema para la salud pública que esta enfermedad representa, en el presente proyecto se caracterizó la actividad farmacológica de dos nuevas moléculas. Éstos compuestos son análogos estructurales de la combretastatina A-4 (CA-4), cuyos núcleos precursores poseen actividad citotóxica en cultivos de células HeLa de cáncer cervicouterino humano. La estructura química de los compuestos citotóxicos se detalla en la Figura 1 en la cual se observa la relación estructural que guardan las moléculas híbridas con sus precursores.

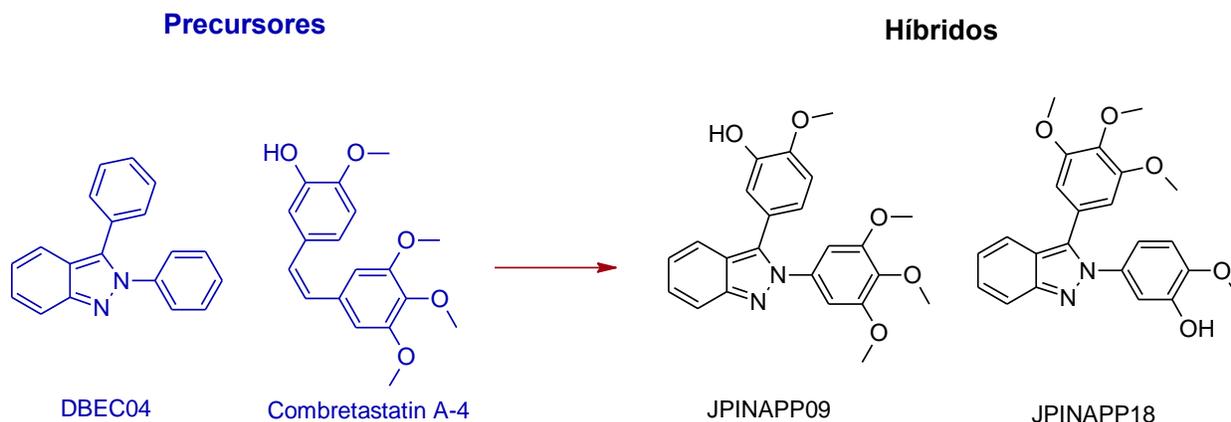


Figura 1. Estructura de los compuestos precursores (DBEC04 y CA-4) y los híbridos (JPINAPP09 y JPINAPP18) que presentan actividad citotóxica en células HeLa.

Hasta el momento no se han descrito las dianas moleculares asociadas con la citotoxicidad de estos compuestos híbridos (Figura 1). Sin embargo, partiendo de las características farmacológicas del precursor CA-4, se propone que dicho mecanismo pudiese estar intrínsecamente relacionado con alteraciones en la polimerización de los microtúbulos, porque son las principales actividades que se hallan ampliamente descritas y caracterizadas en la literatura para CA-4.

II. ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

2.1.1 Definición e incidencia

El cáncer es un conjunto de enfermedades multifactoriales, provocada por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de un grupo de células que son capaces de invadir localmente o a distancia a otros tejidos distantes, en consecuencia, el exceso de células da origen a masas de colonias celulares, denominadas tumores.² No todos los tumores son cancerosos; estos pueden ser benignos o malignos.³ Las células en los tumores malignos son capaces de invadir otros tejidos y presentan mutaciones que les permiten llevar a cabo una división desordenada, debido a que no obedecen a los controles normales de regulación en la proliferación, mecanismos de diferenciación celular, ni a los mecanismos naturales de muerte programada.⁴

De acuerdo con organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo¹. Tan solo en el año 2018 se informó de 9.6 millones de muertes y fue la segunda causa de muerte a nivel mundial. Los principales tipos de cáncer en la población masculina son el pulmonar, prostático, colorrectal, gástrico e hígado; mientras que en la población femenina, son el mamario, colorrectal, pulmonar, cervical y tiroidal.⁶

2.1.2 Desarrollo del cáncer (carcinogénesis)

El cáncer es una enfermedad multifactorial con origen genético, es decir, que es causado por mutaciones en grupos de genes encargados principalmente de controlar el crecimiento y división celulares.

El proceso por el cual se produce el cáncer (carcinogénesis) es ocasionado por mutaciones o anormalidades en el material genético de las células, y estas anormalidades pueden ser causadas por tres agentes etiológicos principales: 1) sustancias químicas, 2) agentes físicos y 3) agentes biológicos.¹ Dentro de los agentes químicos pueden citarse a los agentes alquilantes del ADN y los contaminantes

ambientales. Entre los agentes físicos se encuentran los rayos X y la radiación UV. Dentro de los agentes biológicos podemos citar al virus de Epstein-Barr.¹

Las mutaciones que contribuyen al desarrollo del cáncer pueden estar presentes en: 1) proto-oncogenes, que son genes sensibles a modificaciones que promueven la proliferación celular; 2) genes supresores de tumores, que detienen la proliferación celular; y 3) genes reparadores del ADN. Además de las mutaciones, otras anomalías encontradas en las células cancerígenas son las traslocaciones, amplificaciones, deleciones, y ganancia o pérdida de cromosomas completos.⁴

La carcinogénesis se lleva a cabo en tres etapas: iniciación, promoción y progresión⁴, las cuales se definen a continuación.

El proceso de **iniciación** se describe como la acumulación de mutaciones en una o varias células troncales, mismas que producen alguna modificación en su ciclo celular y desencadenan la resistencia a la apoptosis.⁸

La **promoción** se refiere al evento por el cual se produce la expansión clonal selectiva de las células iniciadas y complementa el desarrollo del cáncer. Esto se puede presentar a través de tres mecanismos que son: inhibición diferencial, estimulación diferencial y recuperación diferencial.⁹

La **progresión** se entiende como el conjunto de mutaciones adicionales que se producen de manera posterior a las adquiridas durante el proceso de iniciación. Estas mutaciones brindan ventajas selectivas a la célula, que son heredadas a su descendencia (selección clonal).⁷

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

De acuerdo con Hanahan y Weinber⁴, la transformación maligna de las células normales ocurre de manera progresiva y es el resultado de la acumulación de factores específicos que desobedecen al equilibrio presente en las células normales. Estos factores incluyen: 1) la adquisición de mutaciones que conducen a una transformación progresiva, 2) evasión de señales que detienen la proliferación, 3) capacidad ilimitada para replicarse, 4) evasión de la apoptosis, 5) síntesis de factores de crecimiento, 6) evasión a la vigilancia del sistema inmune, 7) formación de nuevos vasos sanguíneos, y 8) capacidad de diseminarse a un órgano distinto de su origen.⁴

Por lo tanto, para que una célula sana se vuelva maligna es necesaria la acumulación o combinación estable de dos o más características que pueden entenderse como ventajosas para la proliferación sostenida, o bien, para la evasión de la muerte celular.

2.1.3 Tratamiento del cáncer

El cáncer es un padecimiento muy complejo, que engloba alrededor de 200 enfermedades. Asimismo, la manera en que se presenta y desarrolla de un paciente a otro es muy variable. Esta variabilidad se presenta tanto a niveles celulares como moleculares.¹⁰

Debido a la diversidad y complejidad de esta enfermedad, el tratamiento de la misma es evaluado por especialistas de acuerdo con el tipo de cáncer que presente el paciente. Existen casos en los que la remoción quirúrgica del tumor primario no es suficiente para garantizar la sanación total del paciente

En años recientes ha habido un interés creciente en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas debido a que los procedimientos tradicionales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, son invasivas y desencadenan diversas acciones adversas indeseables en los pacientes.¹¹

Los anticuerpos monoclonales, inhibidores de moléculas pequeñas, tratamientos hormonales y las terapias dirigidas se están convirtiendo en herramientas útiles para los oncólogos en el tratamiento de pacientes con cáncer porque se caracterizan por bloquear

rutas bioquímicas esenciales o proteínas implicadas en el crecimiento y supervivencia de células cancerígenas específicamente, dejando a las células sanas intactas.¹² Lo anterior se traduce en un mejor pronóstico para el paciente. En la actualidad, se cuenta con un gran número de fármacos dirigidos a dianas biológicas específicas, algunas de ellas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer.^{13,14}

Diana	Fármaco	Mecanismo de Acción	Padecimiento
VEGF	Bevacizumab (Avastin®)	Anticuerpo monoclonal humanizado cuya unión a VEGF impide la interacción de este ligando con sus receptores (Flt-1 y KDR) en la superficie de las células endoteliales	Cáncer de mama, cuello uterino, ovario y colorrectal
Cinasas JAK-1 y JAK-2	Ruxolitinib (Jakafi®)	Inhibidor selectivo de las cinasas JAK1 y 2	Mielofibrosis
ADN	Azacitidina (Vidaza®)	Análogo químico del nucleósido citosina. De acuerdo con la dosis en que se administre, puede producir inhibición de la DNA-metiltransferasa, hipometilación del ADN, y citotoxicidad	Síndrome mielodisplásico
Histonas	Vorinostat (Zolinza®)	Inhibe la actividad enzimática de las histonas desacetilasas HDAC1, HDAC2 y HDAC3 (Clase I) y HDAC6 (Clase II)	Linfoma cutáneo de células T
Tubulina	Paclitaxel (Taxol®)	Su unión a la subunidad β de la tubulina estabiliza la polimerización de los microtúbulos, alterando así la flexibilidad del citoesqueleto e impactando negativamente la funcionalidad normal de las células	Sarcoma de Kaposi, y cáncer de pulmón, ovario, mama
	Vinblastina (Velban®)	Se une a los microtúbulos del huso mitótico, lo cual conduce a la detención mitótica y posterior muerte celular	Cáncer de mama, testículo, pulmón, Linfoma Hodgkin

Entre las dianas moleculares más atractivas para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos podemos citar a los microtúbulos (Tabla 1) quienes han sido objeto de investigación y caracterización química, debido al papel vital que juegan durante la división celular y la mitosis, siendo así, elementos cruciales en la supresión del crecimiento de células tumorales.¹⁵

2.2 MICROTÚBULOS

Los microtúbulos son estructuras que constituyen el citoesqueleto de las células eucarióticas. Están implicados en muchas funciones esenciales a lo largo del ciclo celular como el crecimiento y la división de las células, movilidad, tráfico intracelular y la capacidad de adaptación a una variedad de formas para interactuar con el medio ambiente.¹⁵

Físicamente los microtúbulos tienen forma de cilindro hueco y son biopolímeros estables de 25 nm de diámetro externo con longitud variable.¹⁶ Estas estructuras están compuestas por heterodímeros de α -tubulina y β -tubulina que se asocian linealmente para formar protofilamentos, trece de éstos mantienen contacto lateral produciendo así la estructura característica del microtúbulo (Figura 2). Este último está organizado de manera polar de tal manera que la β -tubulina queda expuesta en la terminal positiva (+), mientras la α -tubulina se posiciona en la terminal negativa (-).^{17,18}

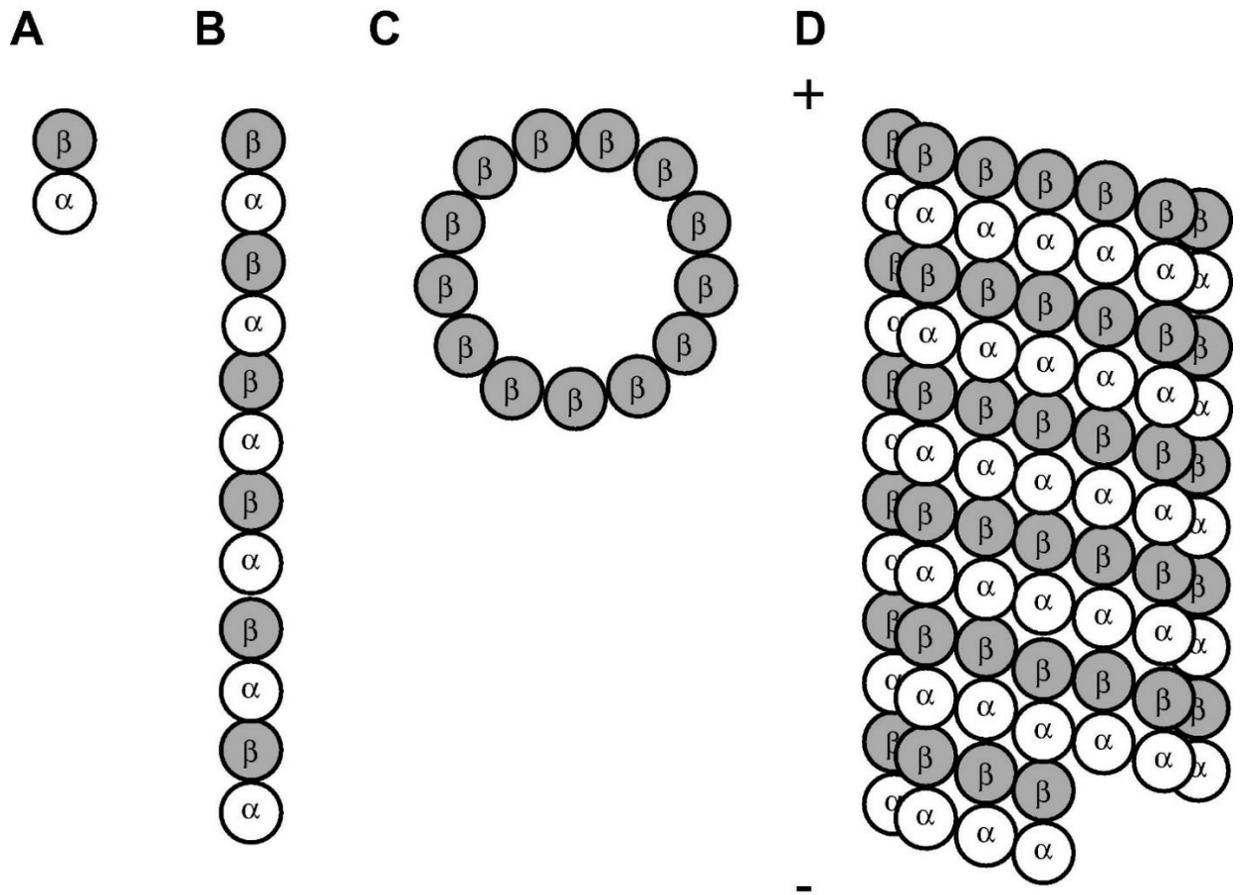


Figura 2. Estructura de los microtúbulos.¹⁹ (A) Los heterodímeros están compuestos de las subunidades α y β ; que se polimerizan para formar (B) protofilamentos. (C) Trece protofilamentos se asocian y el contacto lateral entre éstos resulta en la estructura de los microtúbulos (D), con la subunidad β expuesta en la terminal (+) y la subunidad α en la terminal (-). Tomado de la referencia original

Cada heterodímero contiene dos sitios de unión a nucleótidos de guanina GDP/GTP (Figura 3); el primero está localizado en la subunidad α , donde se une una molécula de GTP de manera irreversible y no hidrolizable, llamado sustrato no-intercambiable (sitio-N). El segundo sitio se encuentra en la subunidad β , allí se une GTP y puede ser intercambiado por GDP (sitio-E),^{18,20}

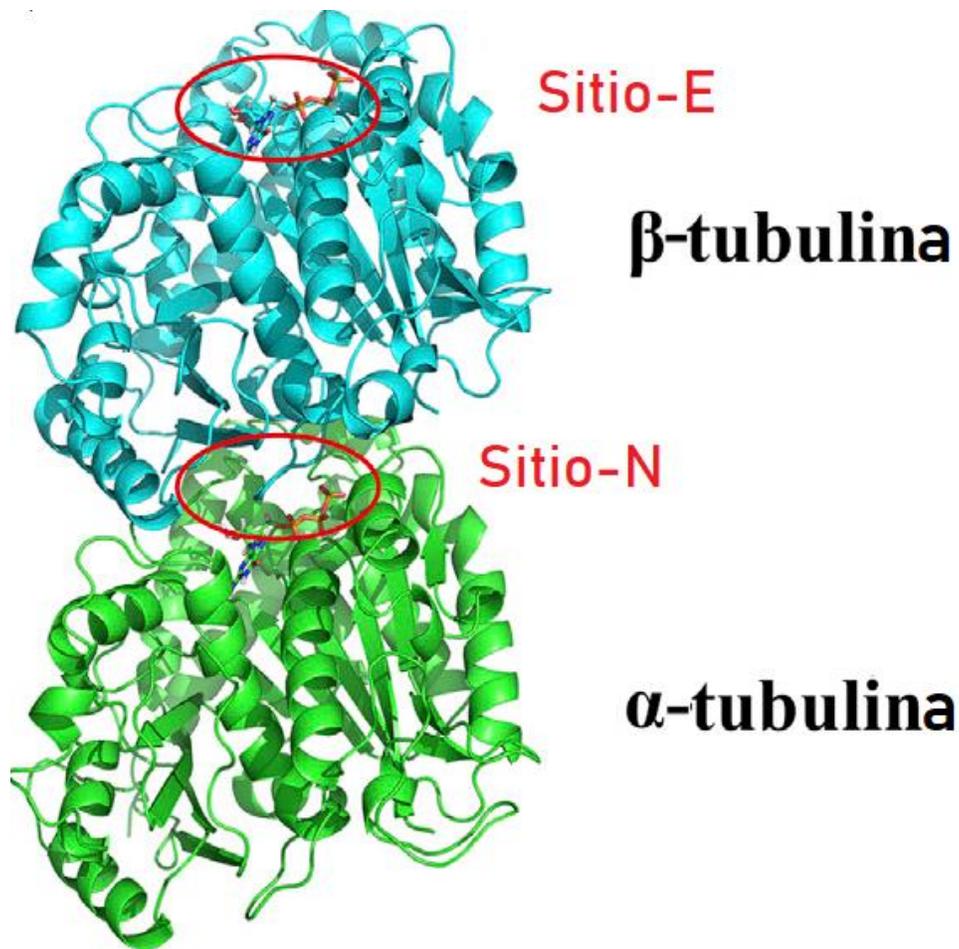


Figura 3. Esquema del heterodímero α/β de la tubulina.²¹ El sitio de unión del nucleótido no intercambiable (sitio N), está situado en la interfaz del dímero y sólo puede unir moléculas de GTP. En cambio el sitio E, está expuesto en la parte superior del dominio β de la tubulina y es capaz de unirse a moléculas de GTP o de GDP. (Editado de la referencia original).

La hidrólisis es necesaria para el ensamblaje de los microtúbulos, sus funciones biológicas en todas las células son reguladas en gran parte por su dinámica de polimerización, es por esta razón que son un blanco atractivo en el diseño de moléculas para atacar el cáncer, a través de la interferencia en su dinámica.²⁰

2.2.1 Equilibrio dinámico de los microtúbulos

Los microtúbulos son altamente dinámicos para llevar a cabo algunas de sus funciones de manera correcta como sostener un adecuado progreso de la división celular, debido a esto, continuamente alternan entre estados equilibrados de polimerización y despolimerización en tiempos que van de segundos a minutos.²²

La dinámica *in vivo* de los microtúbulos se ha descrito a través de dos mecanismos distintos: 1) inestabilidad dinámica y 2) recambio rotatorio (*treadmilling*).²³ El primero ocurre a través de la adición y pérdida de subunidades de tubulina sobre la misma terminal del microtúbulo, mientras que el intercambio rotatorio, involucra la ganancia de tubulina en la terminal (+) del microtúbulo y la pérdida de tubulina en la terminal (-). De los mecanismos anteriores, el proceso de inestabilidad dinámica es el más estudiado y descrito en la actualidad porque es un mecanismo que con frecuencia puede analizarse en estudios *in vitro*.^{22,24}

La inestabilidad dinámica se caracteriza por alternar rápidamente entre estados de crecimiento y acortamiento en la terminal (+) del microtúbulo, y este comportamiento es dirigido por la hidrólisis de GTP. El proceso de crecimiento se denomina “rescate”, mientras que a la transición inversa se le denomina “catástrofe” (Figura 4).²⁵

Cada subunidad de tubulina puede incorporar una molécula de GTP en su respectivo sitio de intercambio de nucleótidos (sitio N en α -tubulina y sitio E en β -tubulina); el GTP incorporado en el sitio-N no se hidroliza y se mantiene de forma constitutiva en la estructura, mientras que en el sitio-E se produce su hidrólisis. El GTP se hidroliza a GDP + Pi en el sitio-E de la β -tubulina²⁶

La hidrólisis del GTP produce un cambio conformacional en los microtúbulos. Cuando el complejo tubulina-GDP adopta una conformación curvada el proceso de adición de nuevas unidades de tubulina está desfavorecido para esta conformación, lo cual produce la apertura de los protofilamentos en la terminal (+) y desencadena el desmontaje de los microtúbulos.²⁷

La despolimerización produce la liberación de heterodímeros α/β -tubulina en el citoplasma. El GDP se une a la β -tubulina libre y puede intercambiarse por GTP en el sitio-E, para reiniciar el ciclo.²⁷

La capacidad de los microtúbulos de polimerizarse y despolimerizarse es un evento clave para la proliferación celular por lo que ha sido atractivo en el diseño de moléculas para atacar el cáncer.

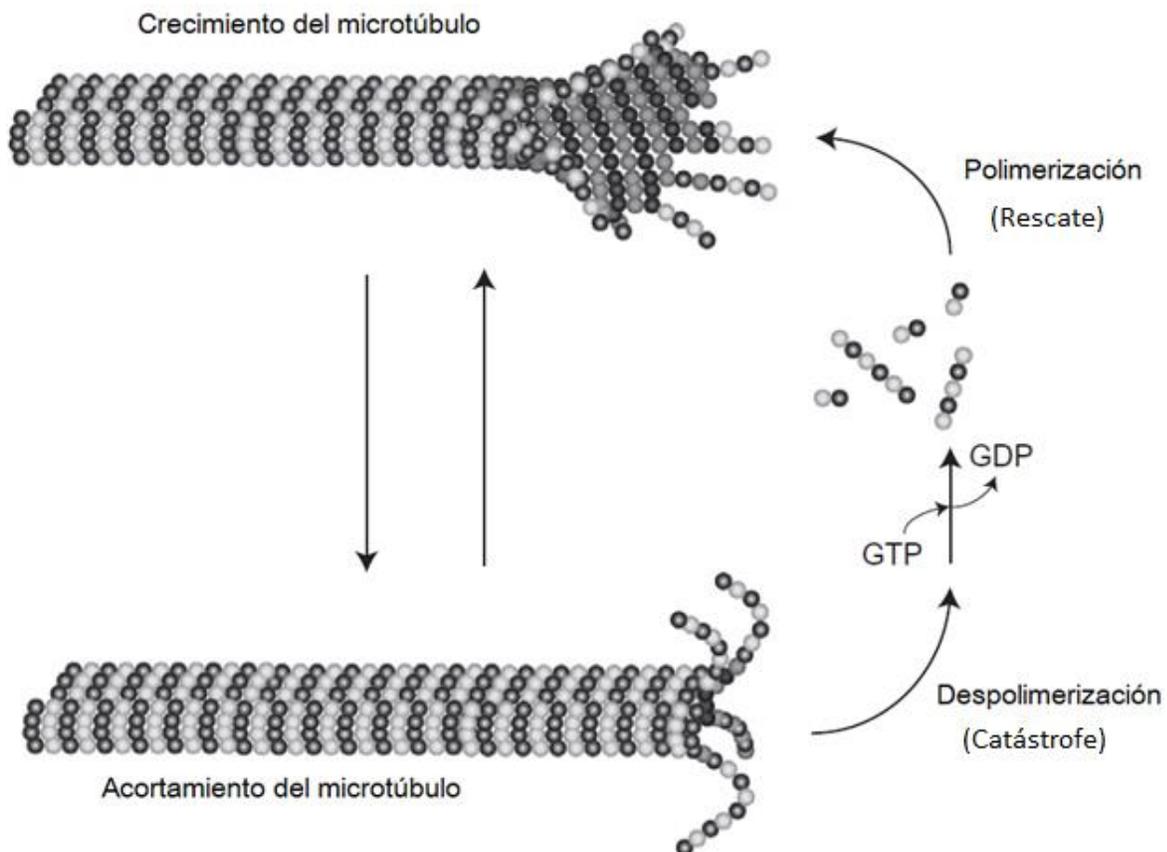


Figura 4. Equilibrio dinámico de los microtúbulos. El GTP unido a tubulina se ensambla en la terminal (+) previniendo la despolimerización de los microtúbulos. Cuando el GTP se hidroliza, el microtúbulo se vuelve inestable y se despolimeriza por protofilamentos individuales curvados hacia afuera, los cuales conducen a la desestabilización de la estructura de los microtúbulos. Finalmente, el GDP se sustituye por GTP en el desensamble de la subunidad de tubulina, reiniciando el ciclo. (Traducida de la referencia original).^{28,29}

Durante la mitosis los microtúbulos se vuelven 100 veces más dinámicos que en interfase¹⁶, este dinamismo permite la adecuada distribución de los cromosomas en las

células que se dividen. Por lo tanto, la segregación de los cromosomas durante la mitosis y el adecuado progreso de la división celular son eventos que determinan la supervivencia celular.

La supresión de la dinámica de los microtúbulos en células tumorales las conduce a mecanismos de muerte celular, por tal razón, los microtúbulos y su dinámica de polimerización son blanco atractivo en el diseño de nuevas moléculas quimioterapéuticas.

2.3 DESCRIPCIÓN DE AGENTES QUÍMICOS QUE SE UNEN A LA TUBULINA

La variedad funcional de los microtúbulos y su dinamismo han posicionado a estas estructuras como dianas novedosas en el diseño de fármacos. En la actualidad, existe una amplia variedad de moléculas que se unen a la tubulina e interfieren el equilibrio dinámico de los microtúbulos.³⁰ Este tipo de compuestos comúnmente son conocidos como agentes de unión a tubulina (TBAs) o agentes de unión a microtúbulos (MTAs) por sus siglas en inglés.

Entre los agentes capaces de unirse a los microtúbulos es posible distinguir dos grupos de acuerdo con su mecanismo de acción: 1) agentes estabilizadores, y 2) desestabilizadores de los microtúbulos (Figura 5).³¹

Los agentes desestabilizadores inhiben la polimerización de los microtúbulos; en este grupo se han descrito compuestos tales como los alcaloides de la vinca, colchicina y sus análogos, los carbamatos de bencimidazol y la rizoxina. El otro grupo corresponde a los agentes estabilizadores, los cuales promueven la polimerización de los microtúbulos; los taxanos, epotilonas, y laulimalida pertenecen a esta agrupación.²²

Ambos grupos interfieren en el equilibrio dinámico de la polimerización de los microtúbulos, dando como resultado un daño en el uso mitótico o daño masivo en la estructura de los microtúbulos, debido a su efecto sobre la formación de huso mitótico aberrantes, ambos tipos de compuestos conducen al bloqueo de la transición de

metafase a anafase, lo cual ocasiona una detención mitótica y con ello la inducción de la apoptosis.³²

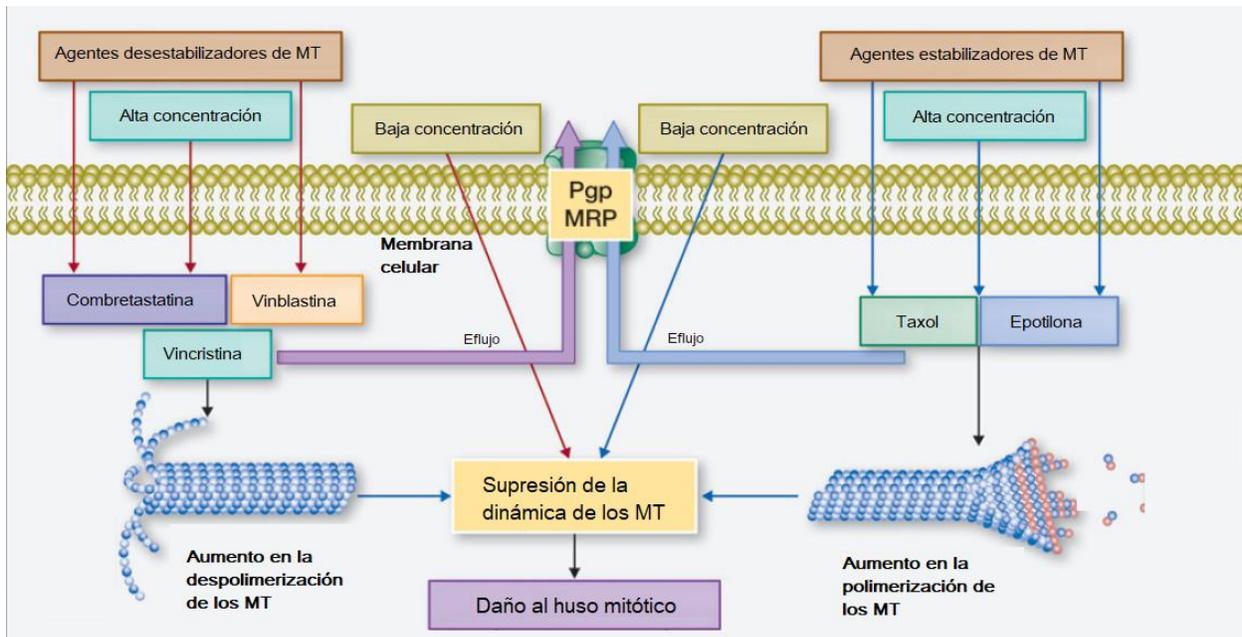


Figura 5. Clasificación de los MTAs de acuerdo con su mecanismo de acción. Los MTAs estabilizan o desestabilizan a los microtúbulos por lo que interfieren con su capacidad dinámica. Tomado de la referencia original.²²

La generación de células aberrantes por interferencia en la dinámica de los microtúbulos es un proceso relacionado con el mecanismo de muerte celular por apoptosis. La generación de células aberrantes por MTAs procede desde la división celular. En un primer evento, la célula es detenida en mitosis prolongada debido a la activación crónica del punto de control del ensamble del huso mitótico (SAC, *spindle-assembly checkpoint*). Esta situación puede llevar a dos acontecimientos; en el primero, se activan mecanismos de muerte mitótica, y en el segundo la salida de la mitosis.^{32,33}

Si la célula consigue salir de la mitosis puede sufrir dos fenómenos: 1) División aberrante dada por la segregación irregular de los cromosomas que tiene como consecuencia la aparición de células aneuploides.³⁴ 2) Entrada a la interfase por escape mitótico (*mitotic slippage*), o bien, por falla en la citocinesis, lo cual da como resultado células tetraploides.³⁵ En ambos fenómenos las células resultantes son propensas a muerte celular programada por los errores generados durante su división o bien, podrían volver

a entrar en división y producir células multinucleadas (poliploides) o aneuploides potencialmente tumorigénicas.¹⁹

Otro cambio que ocurre en el arresto mitótico inducido por MTAs es la lenta degradación de la ciclina B (Figura 6).

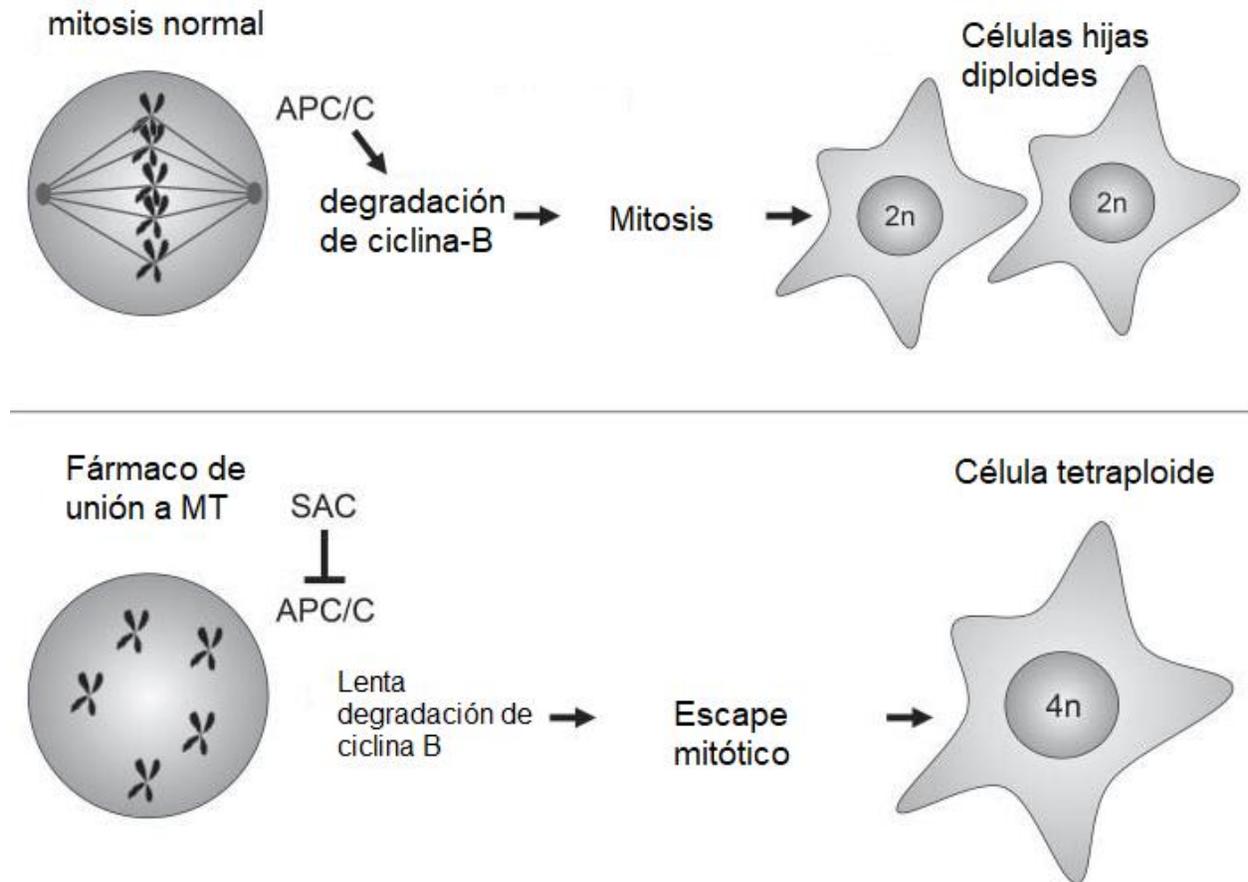


Figura 6. Regulación del escape mitótico (*mitotic slippage*) en células tratadas con agentes de unión a los microtúbulos.³⁶ El panel superior se muestra una célula en proceso de mitosis normal. El complejo APC/C dirige la degradación del regulador de la mitosis, ciclina B, para permitir que las células pasen de la metafase a la anafase y salgan correctamente de la mitosis. El panel inferior muestra una célula tratada con un fármaco que despolimeriza los microtúbulos. Los cinetocoros no unidos en los cromosomas activan al complejo SAC, que inhibe APC/C. La lenta degradación de la ciclina B permite a la célula salir de la mitosis por medio del escape mitótico (*mitotic slippage*), tras un periodo de detención. (Editado de la referencia original)

Por un lado, en el proceso de división normal, la expresión de la ciclina B se incrementa en la fase G2 y posteriormente sufre una rápida degradación vía ubiquitinización tras la desactivación de SAC, cuando han sido correctamente alineados los cromosomas promoviendo adecuadamente la progresión del ciclo celular en la mitosis.³⁷ Por otro lado, cuando las células se encuentran en arresto mitótico, se mantienen una concentración elevada de ciclina B debido a que se degrada lentamente a pesar de la activación crónica de SAC. La disminución de la ciclina B podría estar relacionada con el proceso de escape mitótico ^{37,38}

Los MTAs son muy exitosos como fármacos anticancerígenos y el desarrollo de nuevos MTAs continúa siendo un área importante de investigación. Entre este tipo de compuestos destacan los compuestos híbridos derivados de la combretastatina A-4 (CA-4) puesto que son moléculas estructuralmente sencillas en comparación con agentes naturales como el taxol y la vinblastina.

2.4 ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE LA COMBRETASTATINA A-4

La combretastatina A-4 (CA-4), originalmente aislada del árbol *Combretum caffrum* de Sudáfrica, es un agente desestabilizador de los microtúbulos que inhibe el ensamblaje de microtúbulos debido a su capacidad de unirse a la tubulina en el mismo sitio que la colchicina (Figura 7). CA-4 induce el desmontaje de los microtúbulos, lo que resulta en un dramático efecto citotóxico en varias células cancerígenas humanas.^{39,40}

Los MTAs gozan de reconocida notoriedad como fármacos anticancerígenos aunque su aplicación va más allá de este padecimiento debido a que en la actualidad los microtúbulos son estudiados como blanco biológico de otras enfermedades como el Alzheimer.⁴¹ Sin embargo también hay informes de desarrollo de resistencia por algunos tipos de MTAs, así como efectos adversos. Por ejemplo, la resistencia desarrollada a los taxanos por expresión de la bomba de eflujo por la glicoproteína P asociada a la membrana⁴² y efectos adversos relacionados a la susceptibilidad de los tejidos sanos que se dividen rápidamente tales como los tejidos epitelial y hematopoyético⁴³. Por estas

razones el desarrollo de nuevos MTAs continúa siendo un área importante en la búsqueda de fármacos anticancerígenos.

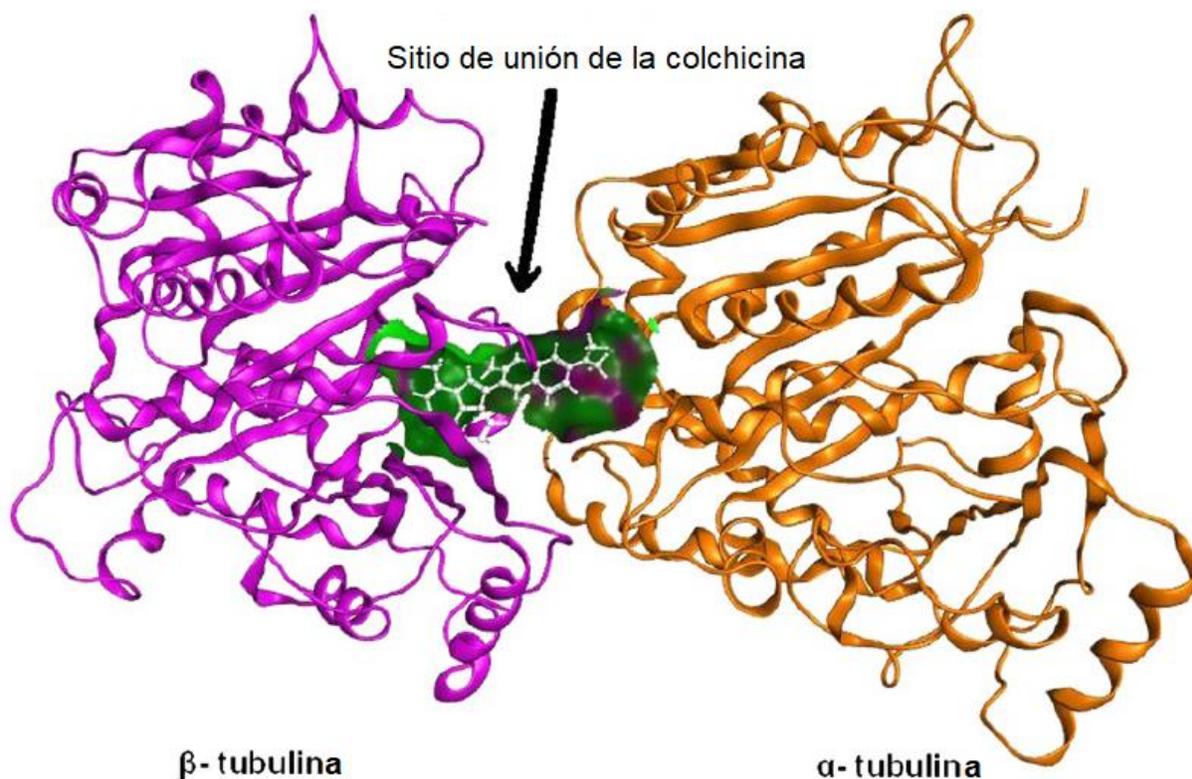


Figura 7. Sitio de unión de la colchicina en la interfaz entre las subunidades α y β de la tubulina. (Editado de la referencia original).⁴⁴

Este proyecto propone la caracterización de la actividad farmacológica de dos nuevos agentes quimioterapéuticos derivados de CA-4 obtenidos por medio de técnicas de hibridación molecular cuyos precursores presentaron actividad citotóxica en estudios *in vitro*⁴⁵ (Tabla 2).

El precursor DBC04 resulta de una serie de síntesis de derivados del 2*H*-indazol que resultaban interesantes como agentes antiparasitarios y antiinflamatorios.⁴⁵ Particularmente, se encontró que éste precursor era el único que poseía una actividad citotóxica significativa dentro de su serie y por ello se seleccionó para realizar la hibridación molecular con CA-4 la cual posee actividad citotóxica demostrada.

Tabla 2. Citotoxicidad de moléculas precursoras (DEBC04 y CA-4) en líneas celulares tumorales.⁴⁶

Línea celular	CI ₅₀ (μM)	
	DEBC04	CA-4
HeLa	125.8 ± 14.8	6.76 ± 2.14
SK-LU-1	96.43 ± 8.65	>120

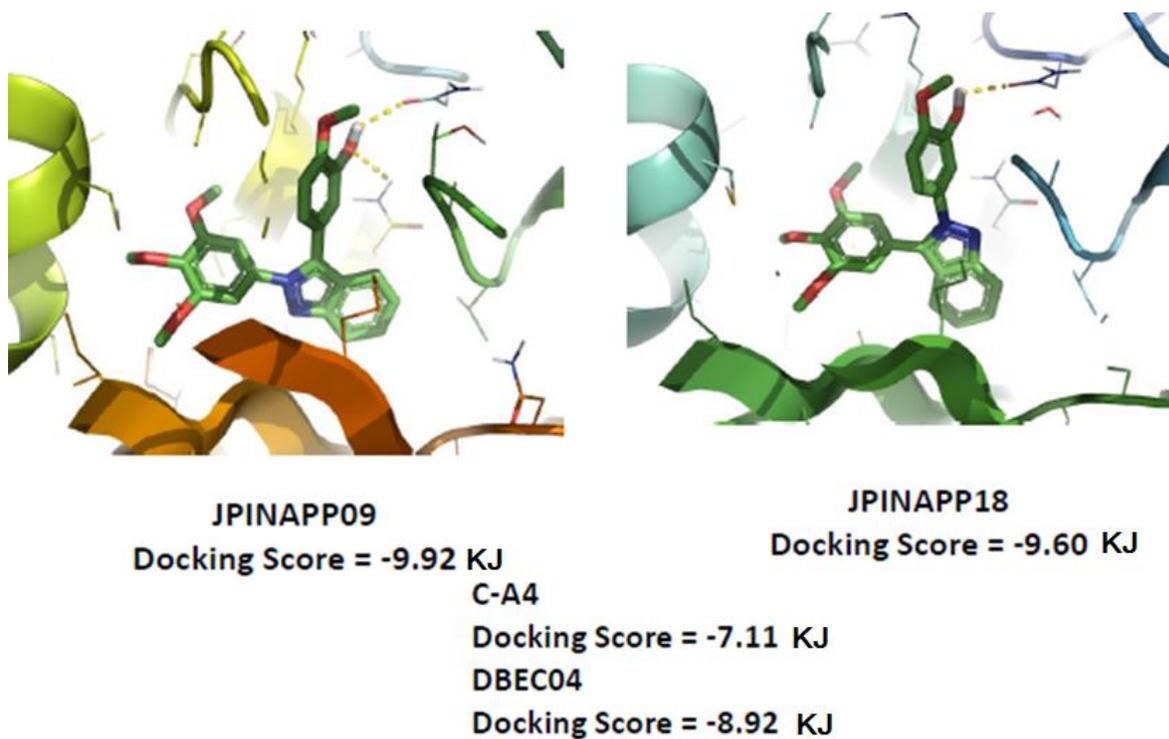


Figura 8. Acoplamiento molecular de las moléculas precursoras y los híbridos moleculares en el sitio de unión a la colchicina.⁴⁵

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, se estima que en 2018 fue la causa de 9.6 millones de muertes. Los cánceres de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los tipos de cáncer más comunes en los hombres, mientras que el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, cervical y tiroides son los más comunes en las mujeres.

Pese a los esfuerzos realizados, el cáncer sigue representando un gran problema en materia de salud pública donde los tratamientos tradicionales son invasivos y conducen múltiples reacciones adversas en los pacientes. Debido a esto, la búsqueda de tratamientos dirigidos que sean selectivos, seguros y eficaces es muy importante.

Las terapias dirigidas representan una alternativa notable frente a los procedimientos tradicionales debido a que son selectivas y seguras. Entre los fármacos que se unen a los microtúbulos aprobados para uso clínico se pueden citar a los agentes de unión a tubulina (TBA), como el paclitaxel y la vinblastina, los cuales presentan un mecanismo de acción mediado por su unión a los dímeros de α/β -tubulina. Además de los citados con anterioridad, el fármaco combretastatina A-4 (CA-4) y sus derivados comparten el sitio de unión de la colchicina en los microtúbulos y desencadenan un efecto citotóxico considerable.

Una estrategia de síntesis química para producir nuevas entidades farmacológicas es la hibridación molecular, la cual es una técnica que consiste en la fusión dos regiones farmacofóricas distintas con la finalidad de obtener moléculas híbridas. El presente proyecto propone la caracterización de la actividad farmacológica de dos nuevos agentes quimioterapéuticos obtenidos por hibridación molecular, ambos análogos estructurales de CA-4, con la finalidad de describir el mecanismo de acción de estos dos compuestos híbridos en líneas celulares neoplásicas.

IV. HIPÓTESIS

Se espera que los compuestos híbridos mejoren la actividad original de la región farmacofórica que los componen, por tal razón, se espera que su actividad citotóxica esté principalmente relacionada con su unión a los microtúbulos, provocando alteraciones en la estructura y funcionalidad de la tubulina. Tales eventos de disrupción del citoesqueleto conducirán al arresto del ciclo celular en fases G2/M, los cuales al no ser resueltos, desencadenarán muerte celular.

V. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

- Evaluar el efecto citotóxico de los compuestos híbridos análogos a CA-4 en la funcionalidad y estructura de la tubulina.

5.2 *Objetivos particulares*

- Determinar la citotoxicidad (CI₅₀) ejercida por los compuestos JPINAPP09 y JPINAPP18 en la línea celular HeLa de cáncer cervicouterino, SK-LU-1 de cáncer de pulmón y K-562 de leucemia.
- Analizar el efecto de los compuestos híbridos sobre la dinámica de polimerización de los microtúbulos.
- Evaluar alteraciones en la progresión del ciclo celular de las células neoplásicas bajo el efecto del tratamiento con los compuestos híbridos.
- Determinar qué tipo de muerte celular inducen los compuestos híbridos en células HeLa previamente tratadas.
- Estudiar si los compuestos híbridos inducen la activación de caspasa-3 en células HeLa bajo tratamiento.

VI. MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

La línea celular HeLa de cáncer cervicouterino, SK-LU-1 de cáncer de pulmón y K-562 de leucemia, fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM (Gibco®), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (SFB) (Gibco®). Ésta se incubó en condiciones normales de cultivo a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % humedad.

6.2 Análisis de la citotoxicidad en líneas celulares.

La evaluación de la eficacia de los dos derivados y las referencias farmacológicas sobre la línea celular HeLa se realizó con el método de MTT; se administró un esquema de tratamiento de 10 a 100 µM, respectivamente, empleando DMSO al 0.28% como vehículo.

En una placa multipozo de 96 pozos fueron sembradas 4,000 células por pozo en medio DMEM (GIBCO-Invitrogen®), enriquecido con SFB al 10 %. Estas células recibieron administración del tratamiento durante 48 h en cada pozo, y se mantuvieron en incubación a condiciones normales de cultivo.

Al finalizar el periodo de incubación, a todos los pozos, se añadieron 20 µL de una solución de MTT (2.5 mg/mL) y se mantuvo en incubación durante 1 h a 37 °C o hasta observar la formación de cristales. Posteriormente, se retiró la mezcla de medio de cultivo y solución de MTT para disolver los cristales de formazán en 200 µL de DMSO y se determinó la densidad óptica empleando un lector de microplacas Epoch®, a una longitud de onda de 540 nm. Finalmente, se obtuvo el porcentaje de viabilidad celular y se calculó el valor de $CI_{50} \pm$ Error estándar de la media (EEM). La determinación de $CI_{50} \pm$ EEM se realizó en el programa *OriginPro* ajustando a un modelo de regresión no lineal.

6.3 Estudios de polimerización *in vitro* de la tubulina

Se realizó el monitoreo *in vitro* de la polimerización de la tubulina siguiendo las indicaciones del fabricante del kit (Cytoskeleton® #BK006P) el cual está basado en la cantidad de luz absorbida que es directamente proporcional a la concentración de polímero de microtúbulos. Se probó el efecto interferente de los compuestos JPINAPP09, JPINAPP18 y CA-4 a una concentración de 10 μM , empleando DMSO al 0.28% como vehículo.

La cinética de polimerización de la tubulina se monitoreó de manera simultánea en tres o cuatro pozos de media área cuyo contenido final fue de 10 μL de compuesto a una concentración de 10 μM y 100 μL de tubulina a 3 mg/mL en 80 mM PIPES, pH= 6.9, 2 mM MgCl_2 , 0.5 mM EGTA, 1mM GTP y 10 % de glicerol. Se registraron las lecturas cinéticas por medio del lector Epoch-2® cada minuto durante 1 h a 340 nm y 37 °C, al término de las lecturas se procedió a realizar el análisis del efecto sobre la cinética de polimerización de la tubulina comparando la V_{max} de las curvas que contenían a los compuestos evaluados contra un control interno del ensayo. El ensayo se realizó una sola vez.

6.4 Evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo

Para estudiar el contenido de ADN de células con diferentes tratamientos, marcadas con yoduro de propidio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mediante citometría de flujo, se realizó la siembra de células HeLa a una cantidad total de 1×10^6 células en cajas Petri de 100 x 20 mm de diámetro al menos 24 h antes de iniciar los diferentes tratamientos. Las células se tratan con los compuestos a 1 Cl_{50} y se incubaron por periodos de 6, 12, 18, 24 y 30 h, respectivamente. También, se trataron células con 0.28% de DMSO (vehículo) a cada tiempo como control. Todos los tratamientos se incubaron en condiciones óptimas para el cultivo celular. El ensayo se realizó una sola vez.

Terminado el tiempo de incubación se recolectó cada uno de los tratamientos por separado en tubos inmersos en hielo debidamente etiquetados. Las células adheridas se desprendieron con PBS-EDTA y se recolectaron en el mismo tubo, posteriormente las

células se fijaron por la adición a goteo de una solución de etanol absoluto al 70 % y se mezcló la muestra suavemente por inversión. En estas condiciones se conservaron a 4 °C, hasta el momento antes de su análisis en el citómetro de flujo.

Previo al análisis de citometría, se eliminó el etanol de cada muestra centrifugando a 1200 rpm por 5 min. El botón celular se lavó con 1 mL de PBS frío y se centrifugó en las mismas condiciones dos veces. Las células se resuspendieron en PBS frío con 2 µl de ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg/mL libre de DNasa y con 200 µL de la solución de yoduro de propidio a 50 µg/mL y tritón X-100 al 0.1%.

Las muestras se incubaron por al menos una hora a temperatura ambiente en oscuridad y las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo BD® FACS Canto II. Los datos de al menos 20,000 eventos adquiridos se analizaron con ayuda del programa ModFit LT®.

6.5 Determinación de la fragmentación del ADN en células HeLa

Se realizó la siembra de 8×10^5 células HeLa por caja Petri de 60 x 15 mm, las cuales contenían cubreobjetos circulares de 16 mm de diámetro previamente esterilizados por radiación UV durante 15 min. Las células fueron tratadas con 0.28 % del vehículo DMSO, la CI_{50} de CA-4 y los compuestos híbridos durante 12, 24 y 36 h bajo condiciones óptimas de cultivo celular. Al terminar el periodo de tratamiento, se retiró el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X previos al proceso de fijación química.

Las células se fijaron en los cubreobjetos circulares añadiendo 1.5 mL de p-formaldehído o PFA al 4 % (v/v) por caja Petri, durante 15 min a 20 °C. Posteriormente fueron bloqueadas con una solución al 3 % de H_2O_2 / MeOH durante 5 minutos y se realizaron dos lavados al término de este tiempo. El proceso de permeabilización de las células se realizó con una mezcla 0.1% Triton X-100/0.1% citrato de sodio en PBS durante 2 min en hielo, se realizaron dos lavados y los cubreobjetos se mantuvieron en solución PBS hasta el momento de la reacción de TUNEL. Se realizó la reacción de TUNEL siguiendo las indicaciones para el kit (Roche® #11 684 795 910), las muestras de reacción se mantuvieron en hielo en todo momento. Previo al marcaje, se retiraron todas las

muestras de PBS y se secaron. Durante el marcaje, se adicionaron 30 μ L de la solución de marcaje con la transferasa terminal a cada muestra y posteriormente se incubaron en atmósfera de humedad por 60 min a 37 °C.

Finalmente, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos, la fluorescencia fue protegida con 10 μ L de la solución protectora Vecta-shield (Sigma-Aldrich®). La señal de inmunofluorescencia se detectó usando un microscopio de epi-fluorescencia (Olympus® Tokio, Japón) a 515-565 nm.

6.6 Análisis por *Western blot* de la proteína caspasa-3

Se sembraron 1×10^6 células/pozo en placas Petri de 100 x 20 mm de diámetro en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB. Transcurridas 6, 12, 18 y 24 h, se administraron los compuestos a su respectiva CI_{50} y se colocaron en incubación a 37 °C, una atmósfera humidificada con 5 % CO_2 durante 24 h. Al concluir este periodo se realizaron tres lavados con PBS y se procedió a la extracción de proteínas.

Para la extracción de proteínas, las células que previamente fueron tratadas se homogeneizaron en amortiguador de lisis (Tris 25 mM, SDS 10%, EDTA 1 μ M, EGTA 1 μ M, inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche®) y se centrifugaron por 20 min a 15 000 rpm. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (Lowry *et al.* 1951).

Después, se separaron 30 μ g de proteínas en un gel de poliacrilamida al 20 % a 90 V por 2 h. La transferencia se llevó a cabo en una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara húmeda a 100 V por 90 min. Posteriormente, la membrana se bloqueó durante toda la noche a 4 °C con una solución de albumina al 5 % y Tween 0.1 % en TBS.

Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios para detectar caspasa-3 (Santa Cruz®) y β -actina (Santa Cruz®). Posteriormente, la membrana se incubó durante 2 h más a temperatura ambiente y en ausencia de luz con los anticuerpos secundarios anti-conejo (Li-Cor®) acoplados a AlexaFluor 480; al final, se reveló con un fotodocumentador/Li-Cor®

VII. RESULTADOS

7.1 Citotoxicidad en líneas celulares

Dado que CA-4 ejerce un efecto citotóxico en diversas líneas celulares, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos híbridos en cultivos de células cancerígenas con la finalidad de confirmar dichas observaciones y obtener información en cuanto a su potencia.

Se halló que los híbridos análogos a CA-4 presentan actividad citotóxica en tres líneas celulares cancerígenas. En cuanto a la potencia de los compuestos híbridos se encontró que su actividad citotóxica es, al menos, 40 veces superior, lo anterior indica que los compuestos híbridos análogos a CA-4 son más activos que sus moléculas precursoras en líneas celulares de cáncer, siendo el compuesto JPINAPP09 el más activo en las tres líneas celulares evaluadas y que presentó una actividad incluso superior a la de CA-4 (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad citotóxica de los híbridos análogos a combretastatina A-4 (CA-4) en líneas celulares de cáncer cervicouterino (HeLa), pulmonar (SK-LU-1) y de leucemia (K-562)

Linea celular	CI ₅₀ (µM)	
	JPINAPP09	JPINAPP18
HeLa	0.16 ± 0.01	38.6 ± 7.51
SK-LU-1	6.63 ± 0.52	25.21 ± 9.06
K-562	1.68 ± 0.27	18.59 ± 1.56

Los hallazgos anteriores confirman las predicciones preliminares realizadas *in silico* sobre la actividad de los compuestos híbridos en líneas celulares, en las cuales ya se sospechaba que la actividad de los híbridos análogos sería mejor que la de los precursores.

A pesar de que se encontró que las tres líneas celulares son susceptibles a los efectos citotóxicos de los híbridos, se descartan del estudio las células K-562 por ser células semi-adherentes que impedirían obtener resultados claros, y por motivos de tiempo y

eficiencia también se descartaron a las células SK-LU-1 esperando obtener resultados similares con las células HeLa al ser ambas de características semejantes.

Debido a que la línea celular HeLa es una de las más susceptibles al efecto citotóxico de los derivados híbridos se decidió observar en ella los daños en la morfología celular que dichos compuestos producen (Figura 9).

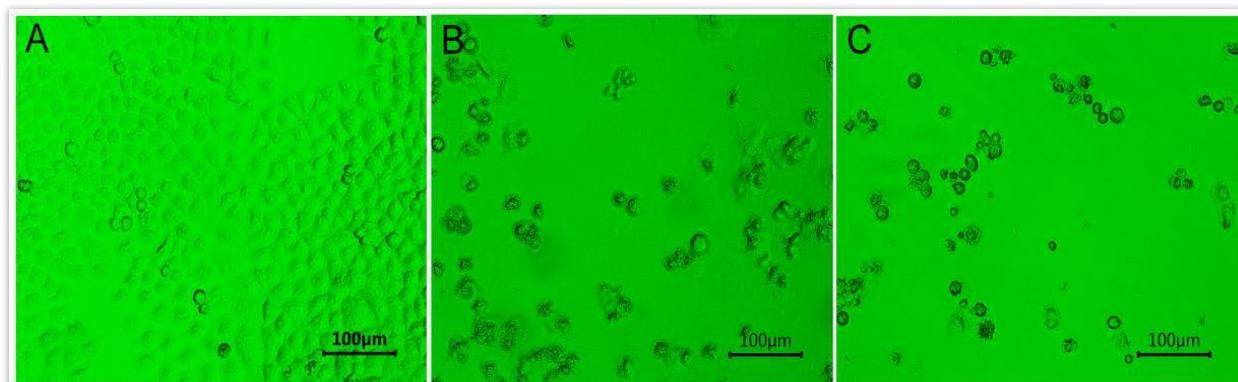


Figura 9. Citotoxicidad de los compuestos híbridos. Los compuestos híbridos inducen daño en la morfología celular de células HeLa a 48 h A) Vehículo (DMSO al 0.28%); B) JPINAPP09; c) JPINAPP18.

En las fotografías de microscopía óptica se puede observar el daño a la morfología celular y la pérdida de la arquitectura epitelial característica de la línea celular HeLa bajo el tratamiento con los compuestos híbridos.

En suma, los resultados de CI_{50} y el efecto sobre la morfología de las células HeLa revelan que la citotoxicidad de los compuestos híbridos afecta la supervivencia celular de células neoplásicas.

7.2 Estudios de polimerización *in vitro* de la tubulina

Para analizar el efecto de CA-4 y los híbridos en la dinámica de ensamblaje de los microtúbulos y observar si existe alguna modificación en esta dinámica, se realizó una curva de polimerización *in vitro* en la cual se midieron las tres etapas de polimerización de la tubulina y se obtiene el parámetro V_{max} de las curvas obtenidas el cual permite analizar si la polimerización se estabiliza o se inhibe, respectivamente.²⁷

Los resultados revelaron que la polimerización de microtúbulos se inhibió en presencia de CA-4 y JPINAPP09 al comparar la curva resultante de estos compuestos con la del control con DMSO. Dicho efecto se refleja tanto en las primeras fases de la cinética como en la disminución del parámetro V_{max} de la curva obtenida, indicando un efecto inhibitorio. Por otro lado, la dinámica de polimerización obtenida en el caso del compuesto JPINAPP18 parece estar retardada únicamente en las fases tempranas de la formación del biopolímero, posteriormente se observa que no produce una disminución significativa del parámetro V_{max} (Figura 10). La curva correspondiente al taxol y al control interno se comportan conforme a lo reportado en la literatura⁴⁷, siendo el taxol el responsable de provocar un incremento en el parámetro V_{max} indicando un efecto estabilizador en la polimerización de los microtúbulos.

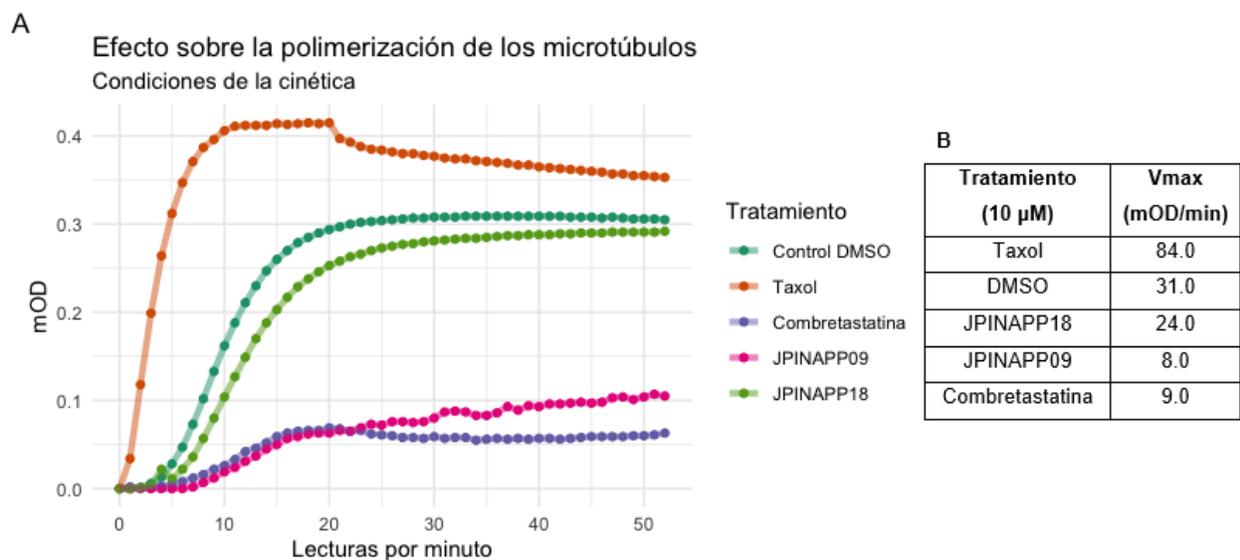


Figura 10. Efecto sobre la polimerización de los microtúbulos. A. Combretastatina y JPINAPP09 a 10 μ M inhiben la dinámica de polimerización de los microtúbulos, Taxol promueve la polimerización de los microtúbulos, compuesto JPINAPP18 no produce efecto en la polimerización. Condiciones de la cinética: Lecturas por minuto a 280 nm durante 1 h y 37 °C en presencia del tratamiento. **B.** Valores del parámetro V_{max} de cada curva obtenida.

En resumen, se observa que el compuesto JPINAPP09 y CA-4 inhiben la polimerización de los microtúbulos, confirmando su efecto inhibitorio a una concentración de 10 μ M, por otro lado, el compuesto JPINAPP18 no produce efecto significativo en la polimerización de los microtúbulos.

7.3 Evaluación del ciclo celular mediante citometría de flujo

El ciclo celular es el nombre con el que se conoce el proceso mediante el cual las células se duplican y dan lugar a dos nuevas células. El ciclo celular tiene distintas fases, que se llaman G1, S, G2 y M. La fase G1 es aquella en que la célula se prepara para dividirse. Para hacerlo, entra en la fase S, que es cuando la célula sintetiza una copia de todo su ADN. Una vez se dispone del ADN duplicado y hay una dotación extra completa del material genético, la célula entra en la fase G2, cuando condensa y organiza el material genético y se prepara para la división celular. El siguiente paso es la fase M, cuando tiene lugar la mitosis. Es decir, la célula reparte las dos copias de su material genético entre sus dos células hijas. Después de haber completado la fase M, se obtienen dos células (de donde había sólo una) y el ciclo celular empieza de nuevo para cada una de ellas.⁴⁸

Ya que la disrupción en la dinámica de polimerización de los microtúbulos desencadena problemas en la progresión del ciclo celular y en específico induce arresto del ciclo celular G2/M, se decidió evaluar el efecto a una CI_{50} del compuesto CA-4 y los híbridos análogos en el ciclo celular por medio del monitoreo del contenido relativo de DNA de células tratadas. A continuación, usamos un citómetro de flujo (BD[®] FACS Canto II) para examinar el efecto de los compuestos en la progresión del ciclo celular en 20,000 eventos celulares. Para el análisis se seleccionó la fluorescencia asociada a una sola célula o *singlets* y se discriminó por tamaño a las células vivas. Células tratadas únicamente con DMSO se usaron como control.

En este ensayo se obtienen picos de intensidad correspondientes al contenido relativo de ADN que es directamente proporcional a la fluorescencia registrada. Un ciclo celular normal contiene dos picos relativos de ADN. El primero y más abundante corresponde a las fases G1/S del ciclo, mientras que el segundo mucho menos abundante corresponde a las fases G2/M.

Como se observa en la Figura 11, es posible apreciar los dos picos de ADN asociados al ciclo celular normal en células tratadas con el vehículo a 6, 12, 24 y 30 h de tratamiento,

por otro lado, se observa que el tratamiento con una CI_{50} del compuesto CA-4 y los híbridos afectan el tamaño del pico asociado a las fases G2/M a las 6 h de tratamiento e inducen arresto del ciclo celular a partir de las 12 h de tratamiento.

El arresto del ciclo celular en las fases G2/M persiste para todos los tratamientos hasta las 30 h de exposición, y a partir de este tiempo, se observa incremento de células en fase sub-G1 para los tratamientos CA-4 y JPINAPP09, lo cual sugiere que el arresto en el ciclo celular induce la activación de mecanismos de muerte celular.

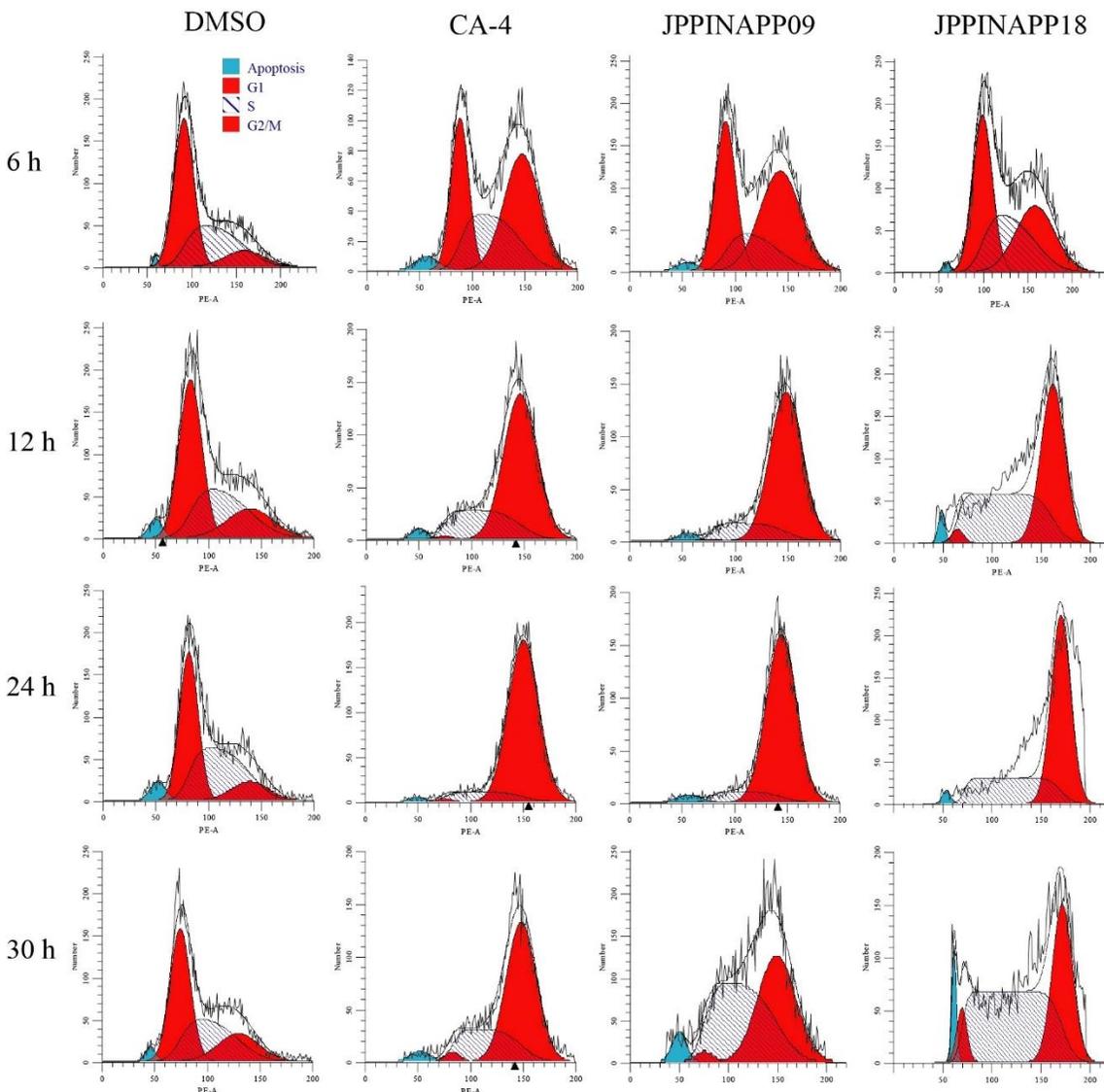


Figura 11. Alteraciones en el ciclo celular de células HeLa. El compuesto CA-4 y los híbridos JPINAPP09 y JPINAPP18, a una CI_{50} , aumentan el tamaño del pico asociado a las fases G2/M a las 6 h de tratamiento, posteriormente inducen arresto del ciclo celular de células HeLa a partir de las 12 h.

7.4 Determinación de la fragmentación del ADN en células HeLa

El ensayo TUNEL es un método de detección de la fragmentación apoptótica del ADN, utilizado para identificar las células apoptóticas, o para detectar la rotura excesiva del ADN en células individuales. El ensayo se basa en el uso de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), una enzima que cataliza la unión de desoxinucleótidos, marcados con un fluorocromo u otro marcador, a los extremos 3'-OH de las roturas de la doble cadena de ADN. Aunque es importante mencionar que también puede marcar las células que tienen el ADN dañado por otros medios que no sean en el curso de la apoptosis.⁴⁹

Una vez confirmada la citotoxicidad de CA-4 y los híbridos análogos en líneas celulares se desea determinar qué tipo de muerte celular inducen los tratamientos, para ello se realizó un ensayo de TUNEL donde es posible determinar fragmentación estructural del ADN de las células previamente tratadas en eventos característicos de muerte celular.

Para evaluar la integridad del ADN de células HeLa en exposición de una CI_{50} del compuesto CA-4 y los dos compuestos híbridos JPINAPP09 y JPINAPP18, se realizó el ensayo de TUNEL a las 12, 24 y 36 h posteriores al tratamiento con los compuestos seleccionados. Los resultados se exponen en el panel fotográfico que se presenta a continuación (Figura 12).

Los resultados obtenidos revelan señales de fluorescencia asociada con la presencia de ADN fragmentado a partir de las 12 h de tratamiento en el caso del derivado JPINAPP18, o desde las 24 h para CA-4 y el híbrido JPINAPP09. Las flechas señalan aquellas células que presentan simultáneamente daño sobre la integridad del ADN y formación de cuerpos vesiculares, morfología que sugiere que el tipo de muerte celular que desencadenan los compuestos evaluados es de tipo apoptótica.

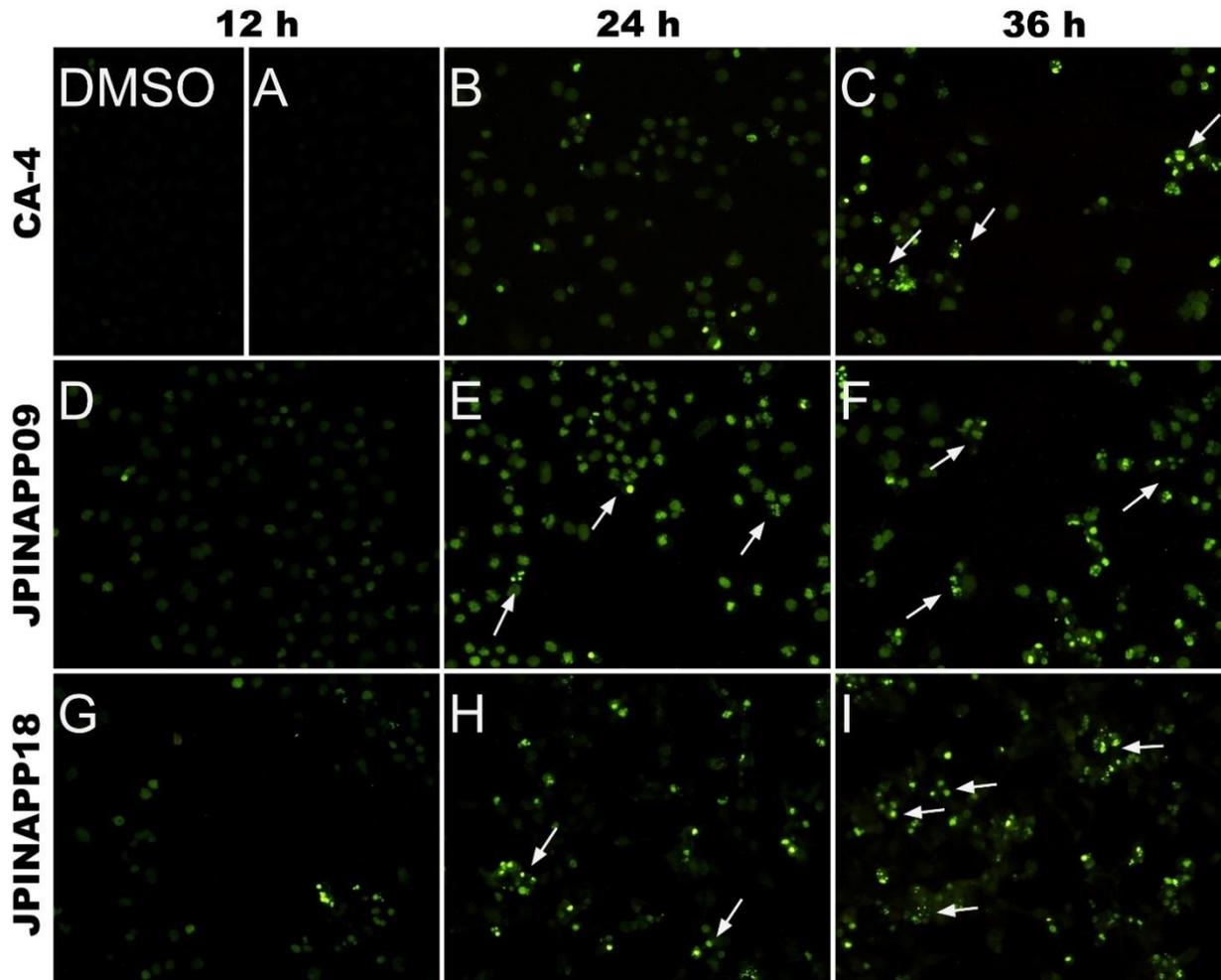


Figura 12. Condensación de la cromatina y corte de ADN. Los compuestos híbridos y la CA-4 interfieren la integridad del ADN en células HeLa a partir de las 12 h de tratamiento.

7.5 Análisis por *Western blot* de la proteína caspasa-3

Se ha descrito que CA-4 es capaz de inducir muerte celular de tipo apoptótica en diversas líneas celulares de cáncer.⁵⁰ Las rutas apoptóticas pueden ser medidas por las proteínas caspasas las cuales son zimógenos que requieren un corte mediado por proteasas para su activación enzimática, y que a su vez nos permiten distinguir entre la vía extrínseca o intrínseca de la apoptosis.

En particular la proteína caspasa-3 es una de varias “caspasas efectoras” pues en ella confluyen la vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis y es responsable de la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN.⁵¹

En el presente estudio se midió mediante un ensayo de *Western blot* si los compuestos híbridos y CA-4 son capaces inducir la activación de la caspasa-3 en células HeLa tratadas (Figura 13).

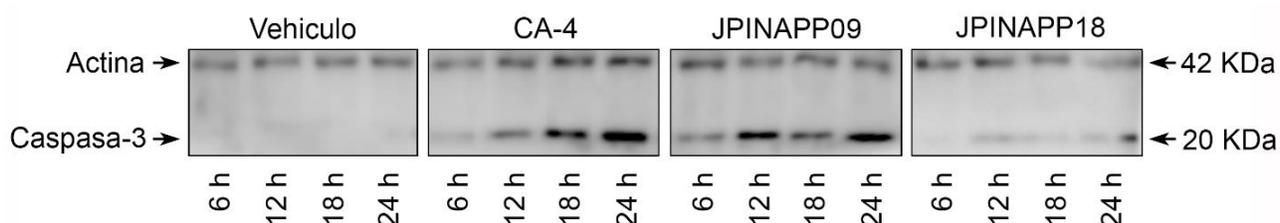


Figura 13. Los compuestos híbridos inducen la activación de caspasa-3. Ensayo de *Western blot* de la proteína caspasa-3 de células HeLa a 6, 12, 18 y 24 h de exposición a los compuestos.

En este ensayo preliminar se encontró que el tratamiento con JPINAPP09 y CA-4 inducen la activación de la proteína caspasa-3 a partir de las 6 h de tratamiento, este hallazgo indica que la ruta de muerte celular por apoptosis se encuentra activa.

VIII. DISCUSIÓN

Actualmente la búsqueda de tratamientos seguros y eficaces para el cáncer es de gran importancia a nivel mundial. La variedad funcional de los microtúbulos y su dinamismo han posicionado a estas estructuras como dianas novedosas en el diseño de fármacos quimioterapéuticos.

Los agentes de unión a los microtúbulos (MTAs) como la combretastatina A-4 (CA-4) gozan de reconocida notoriedad como fármacos anticancerígenos, sin embargo también hay informes de desarrollo de resistencia por algunos tipos de MTAs, así como efectos adversos.⁴³ Por tal motivo se apuesta a la búsqueda de nuevos agentes que presenten mayor eficacia, potencia y/o seguridad.

En el presente proyecto se realizó la caracterización del mecanismo molecular de dos compuestos híbridos análogos a CA-4 cuyos precursores estructurales mostraron actividad citotóxica en cultivos de células HeLa. Se ha postulado que los compuestos híbridos podrían mostrar mejor actividad citotóxica de acuerdo con los estudios de acoplamiento molecular que se realizaron de manera preliminar. Los hallazgos experimentales se analizan a continuación.

Citotoxicidad en células neoplásicas

En la literatura se ha reportado que CA-4 y sus compuestos análogos inducen citotoxicidad de manera eficiente en células cancerígenas⁵² siendo algunas líneas celulares más susceptibles que otras, posiblemente debido al tipo de isoforma de la tubulina que expresan⁵³. En nuestros ensayos se encontró que los compuestos híbridos resultaron ser muy citotóxicos en las tres líneas celulares de cáncer evaluadas, por tal motivo fue necesario confirmar que dicha actividad mantiene relación con su capacidad de unión a la tubulina y por la inhibición de la dinámica de polimerización de los microtúbulos.

Se encontró que el compuesto JPINAPP09, al igual que CA-4, es muy potente para inducir citotoxicidad ya que estos efectos son inducidos por concentraciones inferiores a

10 μM en las tres líneas celulares evaluadas. En el caso del compuesto JPINAPP18 se encontró que la actividad citotóxica es menos eficiente a la de su análogo estructural, aunque sigue siendo igualmente citotóxico.

Dado que los microtúbulos no solo son cruciales durante la división celular sino también son fundamentales para los cambios morfológicos de las células, los fármacos que intervengan la dinámica de polimerización de los microtúbulos inducen también afectaciones en la morfología celular.

En los cultivos celulares los cambios de forma o morfología de una célula pueden ser ocasionados por condiciones intra o extracelulares, se ha observado que bajo la influencia de agentes de unión a los microtúbulos, la frecuencia de los cambios morfológicos que atraviesa una célula se incrementan.^{54,55} Si las células pierden su capacidad de reestablecer su morfología su supervivencia está comprometida.

En las fotografías de campo claro (Figura 9) se observan los efectos tardíos en la morfología celular ocasionados por el tratamiento con los compuestos híbridos y CA-4, mismos que, arrojan indicios de que su citotoxicidad podría estar mediada por su capacidad de interferir la dinámica de polimerización de los microtúbulos. Un análisis microscópico a tiempos tempranos de exposición con los tratamientos mostraría de manera más evidente dicha afectación en la morfología celular.

En resumen los resultados de citotoxicidad obtenidos revelan cómo el tratamiento con los compuestos híbridos afecta la supervivencia celular de células malignas, que se caracterizan por tener una alta tasa de proliferación, lo cual sugiere que el mecanismo de acción está mediado por la unión a los microtúbulos.

Inhibición de la dinámica de polimerización de los microtúbulos

Para confirmar que los compuestos híbridos se unen con afinidad a la tubulina se llevó a cabo el ensayo de polimerización *in vitro*, en el cual es posible analizar la cinética de polimerización de la tubulina en fases y distinguir el efecto inhibitorio o estabilizador de los microtúbulos.^{56,57}

Ya se ha reportado la actividad inhibitoria para CA-4 en estudios *in vitro*⁵⁸, tales ensayos evaluaron su actividad a 1 y 10 μM y se encontró que a bajas concentraciones CA-4 no presenta un efecto inhibitor significativo, por otro lado, también se describió que la actividad inhibitoria óptima es visible a 10 μM .

Tanto para la citotoxicidad como para la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, el efecto máximo de JPINAPP09 y JPINAPP18 se observa con una concentración de 10 μM ; y los resultados obtenidos en la Figura 10 revelan claramente el efecto inhibitorio del compuesto JPINAPP09. Esto sugiere que la citotoxicidad inducida por los compuestos híbridos en efecto está mediada por el bloqueo de la polimerización de los microtúbulos.

Particularmente, en el caso del compuesto JPINAPP18, se observa que la concentración de 10 μM se encuentra por debajo de su CI_{50} , no obstante, es una concentración a la que su análogo estructural presenta su actividad inhibitoria óptima. Este compuesto también afecta la cinética de polimerización de los microtúbulos en su fase de crecimiento exponencial, aunque lo hace de manera más discreta, lo cual sugiere que se une a los microtúbulos por medio de una unión reversible o una cinética más lenta.

Aunque el ensayo se realizó una sola vez y la interpretación de los resultados es preliminar, es un ensayo importante porque nos permite visualizar el efecto inhibitorio de los fármacos híbridos y nos sugiere que estos compuestos análogos a CA-4 mimetizan la actividad inhibitoria sobre los microtúbulos porque conservan la región farmacofórica responsable de dicha actividad.

Alteraciones en el ciclo celular

Los microtúbulos son fundamentales para el adecuado progreso del ciclo celular y para ello mantienen un equilibrio dinámico de polimerización y despolimerización constante. Se espera que los agentes dirigidos a los microtúbulos afecten los puntos de control de la mitosis, la alteración del huso mitótico activa el punto de control del montaje del huso y, como resultado, detiene las células en mitosis.⁵⁹ Actualmente se ha descubierto que la detención mitótica causada por varios fármacos que interactúan con los microtúbulos precede a la apoptosis de las células tumorales.^{60,61}

En nuestros resultados encontramos que, como consecuencia de la inhibición en la dinámica de la polimerización de los microtúbulos, los compuestos híbridos y CA-4 inducen arresto del ciclo celular en la fase G2/M del ciclo celular de manera previa a la inducción de mecanismos de muerte celular (Figura 11).

El seguimiento del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo donde se pudo observar que a partir de las 12 h se observan células con doble contenido de DNA detenidas en fase G2/M. Se ha reportado ampliamente que la CA-4 es capaz de inducir tales efectos sobre el ciclo celular^{62,63}, y el hecho de que los compuestos híbridos también induzcan dicho efecto confirma que el mecanismo de acción de los análogos a CA-4 tiene que ver con la disrupción en la dinámica de polimerización de los microtúbulos.

El arresto prolongado del ciclo celular en fase G2/M aumenta el número de células que desencadenan mecanismos de muerte, tal como se confirma en la Figura 8 en la que se observa que el porcentaje de células en fase sub G0 aumenta de manera proporcional al tiempo del arresto en el ciclo celular.

De esta manera confirmamos que la inhibición de los microtúbulos inducida por los fármacos híbridos ocasiona arresto mitótico de manera previa a la activación de mecanismos de muerte celular, tal y como está reportado en la literatura^{50,60}. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que CA-4 causa la muerte celular son complejos y muy probablemente están mediados a través de vías dependientes y no dependientes de la caspasa, por lo que se espera que el mecanismo de muerte celular de los compuestos híbridos siga rutas similares.

Mecanismos de muerte celular inducida por los fármacos híbridos

De acuerdo con lo descrito en la literatura, se sabe que el CA-4 es un conocido agente desestabilizador de los microtúbulos que inhibe el ensamblaje de sus dímeros^{63,64}, el bloqueo de la dinámica de los microtúbulos conducirá a la muerte apoptótica³². También se ha descrito un mecanismo de muerte celular independiente de las caspasas por arresto mitótico inducido por CA-4⁶².

En el ensayo de TUNEL (Figura 12) se encontraron hallazgos que sugieren que el mecanismo de muerte celular ocasionado por el tratamiento con los compuestos híbridos

podría ser dependiente de caspasas, debido a que inducen fragmentación del ADN de las células tratadas, condensación de la cromatina y formación de cuerpos vesiculares, todos eventos característicos de apoptosis tardía.

A pesar de que en este ensayo podemos encontrar de manera preliminar los eventos característicos de una muerte celular de tipo apoptótica, el ensayo por sí mismo es de naturaleza presuntiva y no concluyente,⁴⁹ por esta razón se llevó a cabo un estudio de *Western blot* de la proteína caspasa-3 para confirmar las observaciones realizadas.

En el ensayo de *Western blot* (Figura 13) encontramos que los compuestos híbridos son capaces de inducir el corte de la proteína procaspasa-3, indicando de esta manera que la ruta apoptótica regulada por caspasa-3 se encuentra activa como resultado del tratamiento. Por otro lado, también fue posible confirmar el efecto inhibitorio sobre la tubulina de los fármacos híbridos y CA-4, permitiéndonos sostener la hipótesis de que las células bajo tratamiento sufren muerte celular de tipo apoptótica por eventos de alteración del citoesqueleto.

Es importante destacar que probablemente los hallazgos observados en el ensayo de TUNEL se deban a la acción directa de la caspasa-3 activa sobre las células bajo tratamiento debido a que la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina son funciones que se le atribuyen específicamente a la proteína caspasa-3 activa.^{51,65}

Como ya se ha mencionado anteriormente, la detención mitótica causada por varios fármacos que interactúan con los microtúbulos precede a la apoptosis de las células tumorales, nuestros resultados confirman esta hipótesis y nos muestran cómo los fármacos híbridos conducen mecanismos de muerte celular dependientes de caspasa.

IX. CONCLUSIONES

Se realizó el estudio del mecanismo molecular de acción de dos compuestos híbridos análogos a combretastatina A-4. Se encontró que ambos compuestos inducen alteraciones en la morfología celular relacionadas con interacciones con el citoesqueleto. Por otro lado, estos compuestos híbridos además son capaces de inhibir la polimerización de la tubulina, actividad que está estrechamente relacionada con su citotoxicidad. Como agentes desestabilizadores de los microtúbulos, los híbridos evaluados, inducen arresto del ciclo celular en G2/M que no puede ser resuelto por los mecanismos regulatorios normales y desencadena mecanismos de muerte celular dependientes de caspasas.

X. PERSPECTIVAS

Debido a que la combretastatina A-4 también es un reconocido agente anti-angiogénico de acuerdo con los reportes de la literatura, se sospecha que los compuestos híbridos podrían conservar dicho mecanismo de acción, por lo tanto es posible evaluar los efectos sobre niveles de expresión de factores pro-angiogénicos en distintos ensayos *in vitro* como con qRT-PCR del factor VEGF en líneas celulares neoplásicas.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. (Consultado: 12 enero 2022)
2. Cancer. Disponible en: <https://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-cancer-institute-nci>. (Consultado: 12 enero 2022)
3. Incan. Disponible en: <http://www.incan.salud.gob.mx/>. (Consultado: 12 enero 2022)
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. National Cancer Institute (NCI). Disponible en: <https://www.cancer.gov>. (Consultado: 12 enero 2022)
6. OMS, estudio estratificado en México (Cáncer). Disponible en: <http://www.who.int/cancer/en/>. (Consultado: 12 enero 2022)
7. Víitor M Valdespino Gómez, V. E. V. C. Cancer initiation and progression: A

- biological system. *Gac. Mex. Oncol.* **10**, 358–365 (2011).
8. American Cancer Society (ACS). Disponible en: www.cancer.org/acs/. (Consultado: 12 enero 2022)
 9. Devita, Vincent T., Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg, (Editors). *Cancer principles & practice of oncology. 6th Edition.* (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
 10. Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J. & Maley, C. C. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 924–935 (2006).
 11. DeVita, V. T. & Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res.* **68**, 8643–8653 (2008).
 12. Baudino, T. A. Targeted cancer therapy : The next generation of cancer treatment. *Curr. Drug Discov. Technol.* **12**, 3–20 (2015).
 13. FDA Approved Drugs. Disponible en: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>. (Consultado: 12 enero 2022)
 14. DrugBank. Disponible en: <https://www.drugbank.com/>.(Consultado: 12 enero 2022)
 15. Hall, A. The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 5–14 (2009).
 16. Valiron, O., Caudron, N. & Job, D. Microtubule dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 2069–2084 (2001).
 17. Downing, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Cell Dev. Biol. J.* **16**, 89–111 (2000).
 18. Downing, K. H. & Nogales, E. Tubulin structure: Insights into microtubule properties and functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 785–791 (1998).
 19. Risinger, A. L., Giles, F. J. & Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 255–261 (2009).
 20. Kaur, R., Kaur, G., Gill, R. K. aur, Soni, R. & Bariwal, J. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. *Eur. J. Med. Chem.* **87**, 89–124 (2014).
 21. Tong, D. & Voth, G. A. Microtubule simulations provide insight into the molecular mechanism underlying dynamic instability. *Biophys. J.* **118**, 2938–2951 (2020).
 22. Mukhtar, E., Adhami, V. M. & Mukhtar, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* **13**, 275–284 (2014).
 23. Akhmanova, A. & Steinmetz, M. O. Tracking the ends: A dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 309–322 (2008).
 24. Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 253–265 (2004).
 25. Mitchison, T. & Kirschner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237–242 (1984).

26. Cassimeris, L., Pryer, N. K. & Salmon, E. D. Real-time observations of microtubule dynamic instability in living cells. *J. Cell Biol.* **107**, 2223–2231 (1988).
27. Bowne-anderson, H., Zanic, M., Kauer, M. & Å, J. H. Microtubule dynamic instability: A new model with coupled GTP hydrolysis and multistep catastrophe. *Bioessays* **35**, 452–61 (2013).
28. Ferreira, J. G., Pereira, A. L. & Maiato, H. Microtubule plus-end tracking proteins and their roles in cell division. en *International Review of Cell and Molecular Biology* **309**, 59–140 (Elsevier Inc., 2014).
29. Cano González, L. Síntesis y evaluación *in-silico* de nuevos carbamatos bencimidazólicos como inhibidores de la polimerización de la β -tubulina. *Fac. Química. UNAM.* (2015).
30. Amos, L. A. What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **22**, 916–926 (2011).
31. Gascoigne, K. E. & Taylor, S. S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* **122**, 2579–2585 (2009).
32. Mollinedo, F. & Gajate, C. Microtubules , microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8**, 413–450 (2003).
33. Brito, D. A., Yang, Z. & Rieder, C. L. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. *J. Cell Biol.* **182**, 623–629 (2008).
34. Rieder, C. L. & Maiato, H. Stuck in division or passing through : What happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* **7**, 637–651 (2004).
35. Cheng, B. & Crasta, K. Consequences of mitotic slippage for antimicrotubule drug therapy. *Endocr. Relat. Cancer* **24**, T97–T106 (2017).
36. Balachandran, R. S. & Kipreos, E. T. Addressing a weakness of anticancer therapy with mitosis inhibitors: Mitotic slippage. *Mol. Cell. Oncol.* **4**, 1–3 (2017).
37. Ito, M. Factors controlling cyclin-B expression. *Plant Mol. Biol.* **43**, 677–690 (2000).
38. Hershko, A. Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin-B. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**, 1571–1576 (1999).
39. Nathwani, S. M. *et al.* Novel cis-restricted β -lactam combretastatin A-4 analogues display anti-vascular and anti-metastatic properties *in-vitro*. *Oncol. Rep.* **29**, 585–594 (2013).
40. Yan, J., Hu, J., An, B., Huang, L. & Li, X. Design, synthesis, and biological evaluation of cyclic-indole derivatives as anti-tumor agents via the inhibition of tubulin polymerization. *Eur. J. Med. Chem.* **125**, 663–675 (2017).
41. Shamitko-Klingensmith, N., Boyd, J. W. & Legleiter, J. Microtubule modification influences cellular response to amyloid- β exposure. *AIMS Biophys.* **3**, 261–285

- (2016).
42. Attard, G., Greystoke, A., Kaye, S. & Bono, J. De. Update on tubulin-binding agents. *Pathol. Biol.* **54**, 72–84 (2006).
 43. Ogden, A., Rida, P. C. G., Reid, M. D. & Aneja, R. Interphase microtubules: Chief casualties in the war on cancer? *Drug Discov. Today* **19**, 824–829 (2013).
 44. Kumar, S. *et al.* Novel indole-bearing combretastatin analogues as tubulin polymerization inhibitors. *Org. Med. Chem. Lett.* **3**, 3 (2013).
 45. Jaime Pérez-Villanueva, Lilián Yépez-Mulia, Ignacio González Sánchez, Palacios-espinoza, J. F. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 2*H*-indazole derivatives : Towards antimicrobial and anti-inflammatory dual agents. *Molecules* **22**, 1–15 (2017).
 46. Pérez-Villanueva, J. *et al.* Synthesis and cytotoxic activity of combretastatin a-4 and 2,3-diphenyl-2*h*-indazole hybrids. *Pharmaceuticals* **14**, 1–17 (2021).
 47. Cytoskeleton & Information, O. Tubulin polymerization assay kit. *Manual* 1–18 (2011).
 48. Brody, L. C. National human genome research institute. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ciclo-celular>. (Consultado: 12 enero 2022)
 49. Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M. & Kioussi, C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. en *Odontogenesis: Methods and Protocols* **887**, 41–47 (2012).
 50. Shen, C., Shee, J., Wu, J. & Lin, Y. Combretastatin A-4 inhibits cell growth and metastasis in bladder cancer cells and retards tumour growth in a murine orthotopic bladder. *Br. J. Pharmacol.* **160**, 2008–2027 (2010).
 51. Porter, A. G. & Ja, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104 (1999).
 52. Karatoprak, G. Ş. *et al.* Combretastatins: An overview of structure, probable mechanisms of action and potential applications. *Molecules* **25**, 2560 (2020).
 53. Vemu, A., Atherton, J., Spector, J. O., Moores, C. A. & Roll-Mecak, A. Tubulin isoform composition tunes microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell* **28**, 3564–3572 (2017).
 54. Tsuda, Y. *et al.* Mitotic slippage and the subsequent cell fates after inhibition of Aurora-B during tubulin binding agent induced mitotic arrest. *Sci. Rep.* **7**, 16762 (2017).
 55. Hoque, M. *et al.* Changes in cell morphology guide identification of tubulin as the off-target for protein kinase inhibitors. *Pharmacol. Res.* **134**, 166–178 (2018).
 56. Shelanski, M. L., Gaskin, F. & Cantor, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 765–8 (1973).

57. Cytoskeleton. Tubulin polymerization assay kit. *Manual* 1–20 (2011).
58. Ojike, F. O., Lavignac, N. & Casely-Hayford, M. A. Synthesis and *in-vitro* bioactivity of polyunsaturated fatty acid conjugates of combretastatin A-4. *J. Nat. Prod.* **81**, 2101–2105 (2018).
59. Rudner, A. D. & Murray, A. W. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 773–780 (1996).
60. Jordan, M. A. *et al.* Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res.* **56**, 816–825 (1996).
61. Woods, C. M., Zhu, J., Mcquaney, P. A., Bollag, D. & Lazarides, E. Taxol-Induced Mitotic Block Triggers Rapid Onset of a p53-Independent Apoptotic Pathway. *Mol. Med.* **1**, 506–526 (1995).
62. Nabha, S. M. *et al.* Combretastatin-A4 prodrug induces mitotic catastrophe in chronic lymphocytic leukemia cell line independent of caspase activation and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage-1. *Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2735–2741 (2002).
63. Kanthou, C. *et al.* The tubulin-binding agent combretastatin A-4-phosphate arrests endothelial cells in mitosis and induces mitotic cell death. *Am. J. Pathol.* **165**, 1401–1411 (2004).
64. Dark, G., Hill, S. A., Tozer, M., Pettit, R. & Chaplin, D. J. Advances in brief combretastatin A-4 , an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res.* **57**, 1829–1834 (1997).
65. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: A molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825–2837 (2004).