



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**



**LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**PROPIEDADES ANTITUMORALES DE COMPUESTOS DERIVADOS  
DE TIOSEMICARBAZONAS EN MODELOS *IN VITRO* DE CÁNCER**

# **TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA**

**MARCO ANTONIO MANCERA RODRÍGUEZ**

**Tutor**

**DR. FELIPE VACA PANIAGUA**

**Coasesor**

**DRA. ADRIANA MORENO**

**Tlalnepantla, Estado de México**

**Agosto de 2016**





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.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	4
ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
1. MARCO TEÓRICO .....	10
1.1 Generalidades de cáncer.....	10
2.1 Tratamientos para el cáncer.....	15
3.1 Generalidades Tiosemicarbazonas .....	19
4.1 Actividad Biológica .....	20
5.1. Actividad antitumoral.....	23
2.JUSTIFICACIÓN .....	27
3. HIPÓTESIS .....	28
4. OBJETIVOS .....	29
5. METODOLOGÍA .....	30
5.1. Síntesis de tiosemicarbazonas .....	30
5.1.1 Estructuras químicas de las tiosemicarbazonas .....	30
5.2. Cultivo celular.....	32
5.3. Viabilidad celular .....	32
5.4. Análisis estadístico .....	32
5.5 Ensayo de combinación cisplatino-TSC .....	33
6.-RESULTADOS.....	34
6.1 Viabilidad celular .....	34
6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 (CI <sub>50</sub> ).....	41
6.3 Ensayo de combinación cisplatino-TSC .....	42
7.-DISCUSIÓN .....	46
8.-CONCLUSIÓN .....	52
ANEXO .....	53
9.- PERSPECTIVAS .....	56
10. BIBLIOGRAFÍA .....	57

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quisiera agradecer a mis padres por apoyarme incondicionalmente en mi formación y en mis estudios en especial a mi madre María Cristina Rodríguez Zamora por siempre impulsarme a superarme y a terminar está trabajo.

Al Dr. Felipe Vaca Paniagua por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio y que gracias a su apoyo y dirección poder realizar este trabajo, también quiero agradecer a todos mis compañeros del laboratorio 13 (Stef, Héctor, Rosie, Monse, David, Maciel y Ernesto) y a la Dra. Clara que de alguna manera contribuyeron en el desarrollo de esta tesis y a mi compañero Marco Vázquez por ayudarme en la parte de cultivo celular.

A la Dra. Adriana Moreno Rodríguez ya que fue una pieza fundamental de este trabajo fungiendo como coasesora, apoyándome en todo el proceso como la experimentación y a lo largo de este trabajo también a su equipo de trabajo de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, por la síntesis de los compuestos empleados.

A mi compañera de generación y amiga Mariela Castillo Cabrera, quien en los momentos difíciles y de frustración, me ayudó a seguir adelante.

A mis sinodales, por su apoyo y excelente disposición para la realización de los trámites de titulación y por contribuir con su experiencia en el presente estudio.

Y por último a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, que aparte de ser mí casa de estudios fue testigo de todo el trabajo y esfuerzo ya que fue realizada en sus instalaciones y que con este trabajo se aporte algo a la comunidad científica.

## ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
ACS	Sociedad Americana contra el Cáncer (por sus siglas en inglés)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BCG	<i>Bacillus calmette guerin</i>
CI <sub>50</sub>	concentración inhibitoria 50
CDDP	cisplatino
CMDN	Cáncer de mama doble negativo
CMTN	Cáncer de mama triple negativo
DMSO	dimetil sulfóxido
Dntp	desoxinucleósido trifosfato
ECC	específicos del ciclo celular
ER	Receptor de estrógenos (por sus siglas en inglés)
HCT's	Tiosemicarbazonas heterocíclicas
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (por sus siglas en inglés)
h	horas
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (por sus siglas en inglés)
IMP	Inosina monofosfato
μM	micromolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
NECC	no específicos del ciclo celular
nm	nanometro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PR	Receptor de progesterona (por sus siglas en inglés)
RDR	ribonucleótido difosfato reductasa
RNR	ribonucleotido reductasa

ROS	especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés)
TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento $\beta$ transformante (por sus siglas en inglés)
TSC	Tiosemicarbazonas
UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (por sus siglas en inglés)

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial (ambos sexos).  
Basada en  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
- Figura 2. Tasas de mortalidad de enfermedades no transmisibles en México (Ambos sexos).  
Basado en [http://www.who.int/nmh/countries/mex\\_es.pdf?ua=1](http://www.who.int/nmh/countries/mex_es.pdf?ua=1).
- Figura 3. Estructura general de las tiosemicarbonas
- Figura. 4 Estructura de la Triapina
- Figura 5. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin tratamiento (Ct) y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M de cisplatino (A) y TSC1 (B) a 24 y 48 horas. N= 3. \*\*\*: P <0.001.
- Figura 6. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 2 (A) y TSC 3 (B) a 24 y 48 horas.
- Figura 7. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 4 (A) y TSC 5 (B) a 24 y 48 horas. \*\*: P< 0.01.
- Figura 8. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231 sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 6 (A) y TSC 7 (B) a 24 y 48 horas.
- Figura 9. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7 sin tratamiento (Ct) y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M de cisplatino (A) y TSC1 (B) a 24 y 48 horas. \*\*\*: P <0.001.
- Figura 10. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 2 (A) y TSC 3 (B) a 24 y 48 horas. \*\*: P< 0.01; \*\*\*: P <0.001.
- Figura 11. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 4 (A) y TSC 5 (B) a 24 y 48 horas. \*\*\*: P <0.001.

Figura 12. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu$ M TSC 6 (A) y TSC 7 (B) a 24 y 48 horas. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Figura 13. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu$ M, (TSC1 40) TSC1 a 40  $\mu$ M, (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu$ M, (TSC1 80) TSC1 a 80  $\mu$ M, (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Figura 14. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu$ M, (TSC5 40) TSC5 a 40  $\mu$ M, (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu$ M, (TSC5 80) TSC5 a 80  $\mu$ M, (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Figura 15. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu$ M, (TSC7 40) TSC7 a 40  $\mu$ M, (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu$ M, (TSC7 80) TSC7 a 80  $\mu$ M, (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas.



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los fármacos antineoplásicos de acuerdo a un mecanismo de acción.

Tabla 2. Estructura química de los 7 compuestos derivados de tiosemicarbazonas utilizados.

Tabla 3. Concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de los compuestos evaluados en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7.

## RESUMEN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad, alcanzando en el año 2012, 14.1 millones de nuevos casos. En la actualidad existen 32.6 millones de personas viviendo con esta enfermedad, lo que representa un problema de salud pública a nivel mundial. Los cánceres más frecuentes son, en hombres, los de pulmón, próstata, colorrectal y en mujeres el cáncer de mama, cérvico-uterino y colon. En México el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos. El tratamiento más utilizado contra esta enfermedad es la quimioterapia, lamentablemente esta estrategia terapéutica presenta efectos secundarios para el paciente que limitan su uso. Dentro de la quimioterapia destaca el uso del cisplatino, uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados contra diferentes tipos de cáncer como de los de vejiga, cuello uterino, esófago, cabeza, cuello, ovario y testículo. Sin embargo, a pesar de su alta eficacia terapéutica, su principal limitante es su alta nefrotoxicidad y ototoxicidad, obligando a detener o suspender el tratamiento para el paciente. Lo anterior pone de manifiesto la importante necesidad de encontrar nuevos agentes antitumorales con mayor margen de seguridad y efectividad, los cuales puedan complementar a los actuales y administrarse en combinación para beneficio del paciente.

Una alternativa terapéutica antitumoral reciente son las tiosemicarbazonas y semicarbazonas, moléculas producidas a partir de una reacción entre una tiosemicarbazida o una semicarbazida con un grupo carbonilo de una cetona o un aldehído. Estos compuestos terapéuticos presentan un amplio perfil farmacológico y tienen propiedades antitumorales, antivirales, antifúngicas, antibacterianas y antiparasitarias. En este trabajo, evaluamos la inhibición en la viabilidad celular en dos líneas de cáncer de mama causada por siete compuestos derivados de tiosemicarbazonas y se determinaron la  $CI_{50}$  de cada uno, comparando sus efectos con los del cisplatino. En ensayos de combinación cisplatino-TSC se encontró que la tiosemicarbazona 5 tuvo un efecto aditivo con el cisplatino.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 Generalidades de cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células con alteraciones moleculares que invaden el tejido adyacente y sitios anatómicamente distantes, eventos que pueden llevar a la muerte del paciente (OMS, 2015).

Para el caso de los tumores epiteliales, las células cancerosas forman masas de tejido sólido llamadas tumores. Podemos encontrar dos tipos de tumores: (i) los tumores benignos, que son formaciones autolimitadas que se extienden a otros tejidos, no causan metástasis y se desarrollan en un sitio concreto. Por otra parte, (ii) los tumores malignos continúan con su proliferación e invasión de tejidos cercanos, son capaces de extenderse a través del torrente sanguíneo o los vasos linfáticos, induciendo la formación de nuevos tumores malignos; un proceso conocido como metástasis (Tamarin, 1996).

Algunos de los sitios más comunes para la proliferación cancerosa son el tejido mamario, el colon, la próstata, hígado, pulmones, nódulos linfáticos, medula ósea y el cerebro (Liotta, 1986). El crecimiento tumoral, en general, tiene las siguientes características fenotípicas distintivas:

Potencial replicativo ilimitado, auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), angiogénesis mantenida, capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis, posteriormente se adicionaron a la lista de estos sellos distintivos del cáncer la inflamación, la capacidad de evadir su destrucción por el sistema inmune, alteraciones del metabolismo energético tumoral, inestabilidad genómica y mutación (Hanahan y Weinberg, 2000 y 2011).

Retomado por el grupo de trabajo de Kumar *et al* en 2005, donde se mencionan algunas características de las células cancerosas, como que la proliferación puede ser independiente de mutágenos exógenos, llevándose a cabo por la activación de oncogenes, como los tumores que no respondan al TGF- $\beta$  y a inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas por la inactivación de p53 (resistencia a apoptosis), en defectos en la reparación del ADN como causar un daño al

complejo enzimático encargado de la reparación celular y por lo tanto provocando la presencia de mutaciones, La célula cancerosa también presenta inmortalidad, mostrando un gran potencial de proliferación sin restricciones en el número de divisiones celulares. Este mecanismo es activado por la telomerasa, la cual se encarga del mantenimiento de la longitud y función del telómero. Otra característica es la presencia de angiogénesis que se refiere a la capacidad de formar nueva vascularización, induciendo la formación de nuevos vasos sanguíneos gracias a la activación de factores como VEGF y finalmente a la capacidad de invadir otros tejidos lo que se conoce como metástasis, lo que permite a la célula cancerosa la capacidad de transportarse por el torrente sanguíneo y proliferar en diferentes órganos (Kumar *et al*; 2005).

En 1996, Tamarin clasificó a los tipos de cáncer dependiendo del tipo de células originalmente implicadas; empezando por la leucemia, caracterizada por una sobreproducción de glóbulos blancos; los linfomas son enfermedades de los nódulos linfáticos y del bazo causando la producción excesiva de linfocitos. Por otra parte, los sarcomas son tumores de los tejidos del mesodermo embrionario como el músculo, el hueso y el cartílago. Los carcinomas que son tumores que surgen del tejido epitelial como las glándulas, las mamas, la piel y revestimientos de los sistemas respiratorio y urogenital, son los tumores más frecuentes, alcanzando hasta el 80% de incidencia de todas las neoplasias (Tamarin, 1996).

De manera general, la Sociedad Americana contra el Cáncer en 2014 definió factores de riesgo para los diferentes tipos de cáncer, los cuales incluyen elementos externos como el consumo de tabaco, la exposición a organismos infecciosos, compuestos químicos, y radiación; los factores de riesgo intrínsecos incluyen las mutaciones heredadas, la exposición a hormonas endógenas, condiciones inmunes y mutaciones producidas por el metabolismo. Estos factores causales pueden combinarse o actuar en secuencia para iniciar o promover el desarrollo de cáncer (ACS, 2014).

A nivel epidemiológico, el cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que en la actualidad 32.6 millones de personas viven con esta enfermedad. Asimismo, su incidencia, según las estadísticas más recientes de la Agencia

Internacional para la Investigación del Cáncer, alcanzó 14.1 millones de casos y su mortalidad es de 8.2 millones en 2012 (IARC, 2012), como se puede observar en la Figura 1. En el mismo año la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó a los cánceres más frecuentes a nivel mundial: el de pulmón, próstata, colorrectal y en mujeres el cáncer de mama. En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer, el cáncer es la tercera causa de muerte como se observa en la Figura 2 (OMS, 2012). Se estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (SSA y SPPS, 2013). En orden de frecuencia considerando ambos sexos, los principales tumores malignos se localizan en el pulmón, bronquios, estómago y próstata. En hombres, el primer lugar lo ocupa el cáncer de próstata con 8.9 casos por cada 100,000 habitantes, en segundo lugar el cáncer de pulmón y en tercer lugar el cáncer de estómago. En mujeres, la primera causa de mortalidad es el cáncer de mama con 8.9 casos por cada 100,000 habitantes, seguido por el cáncer de cérvico-uterino (Sosa-Durán y García-Rodríguez, 2013). En nuestro país, considerando ambos sexos, los cánceres de mayor incidencia son el de mama, próstata, cérvix y colon, y los de mayor mortalidad son los de próstata, mama, cérvix y pulmón, como se observa en la Figura 3 (GLOBOCAN, 2012).

### CANCER A NIVEL MUNDIAL: AMBOS SEXOS

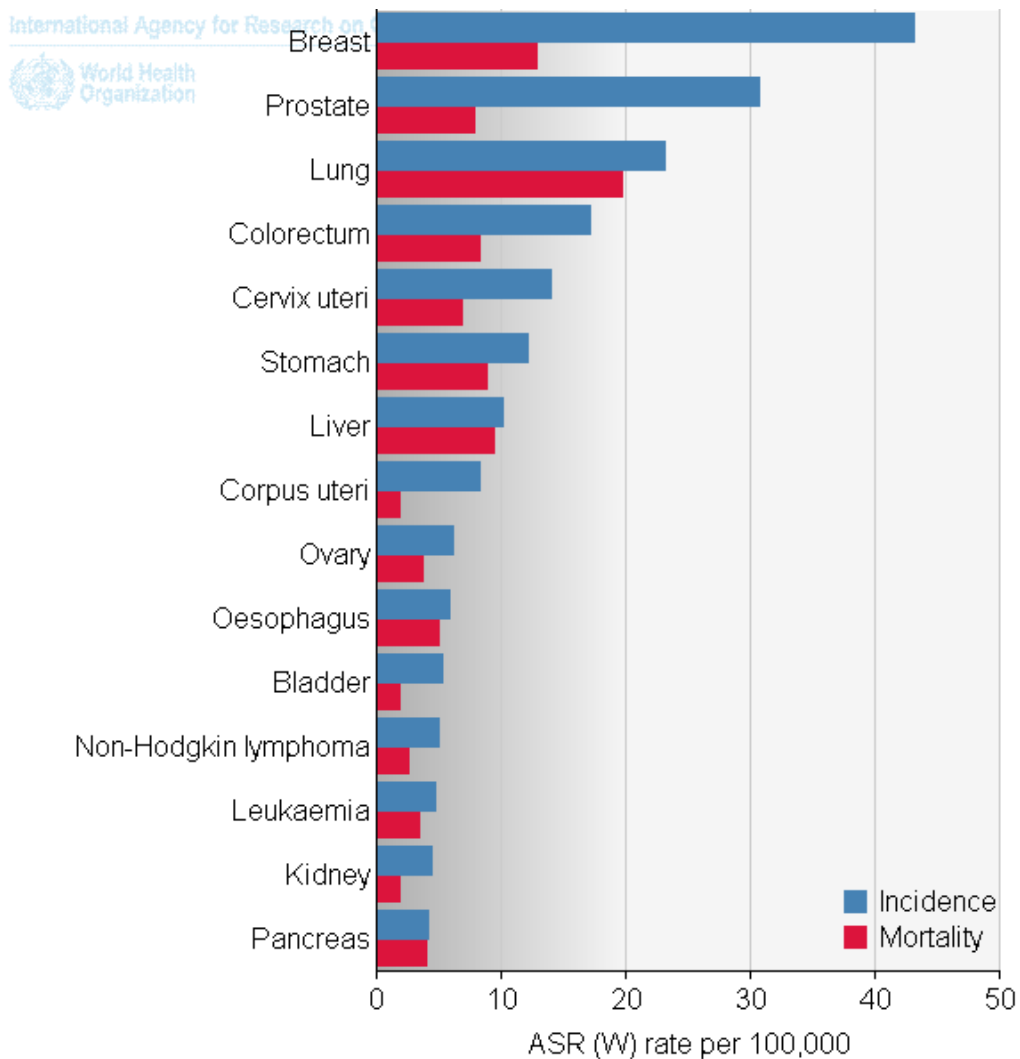


Figura 1. Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial (ambos sexos). Datos tomados de GLOBOCAN, 2012.

# México

Población total: 121 000 000

Grupo de ingresos: Medianos altos

## Tasas de mortalidad estandarizadas por edades

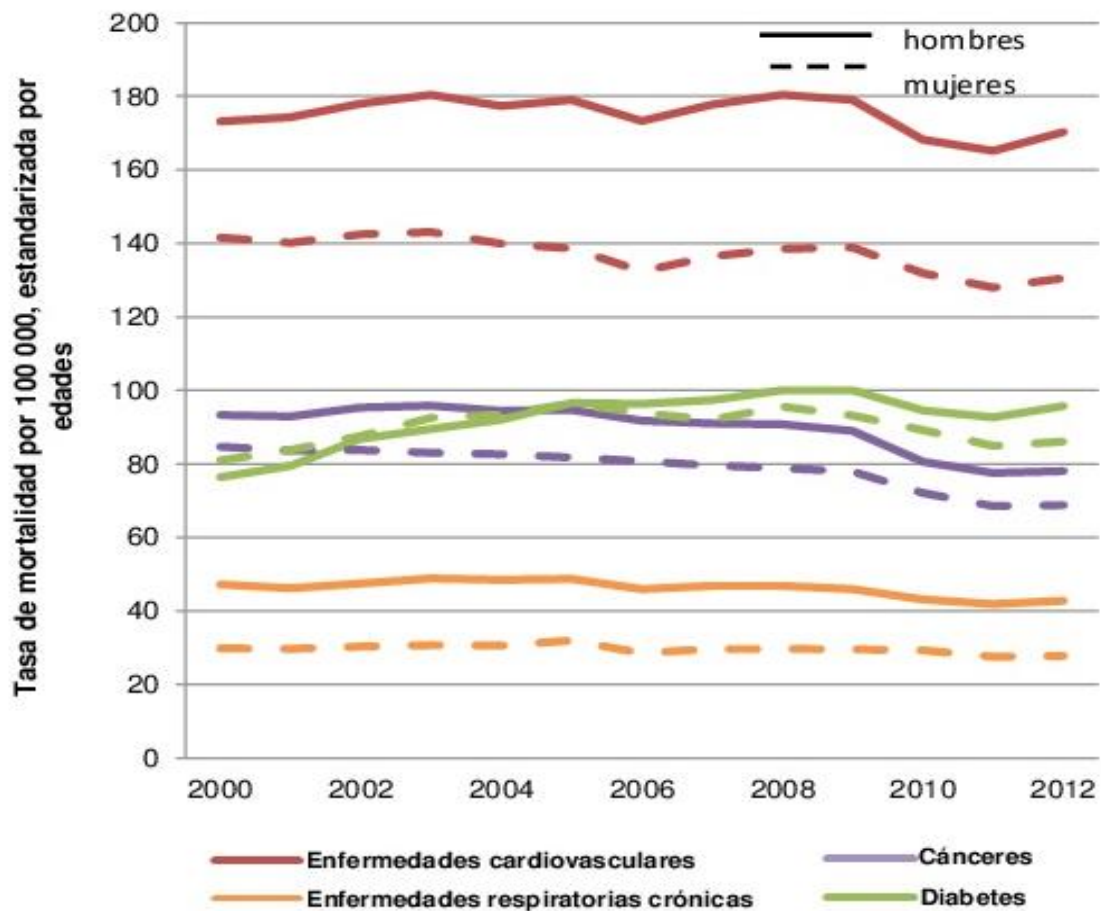


Figura 2 Tasas de mortalidad de enfermedades no transmisibles en México (Ambos sexos). Datos tomados de OMS, 2012.

### CANCER EN MÉXICO AMBOS SEXOS

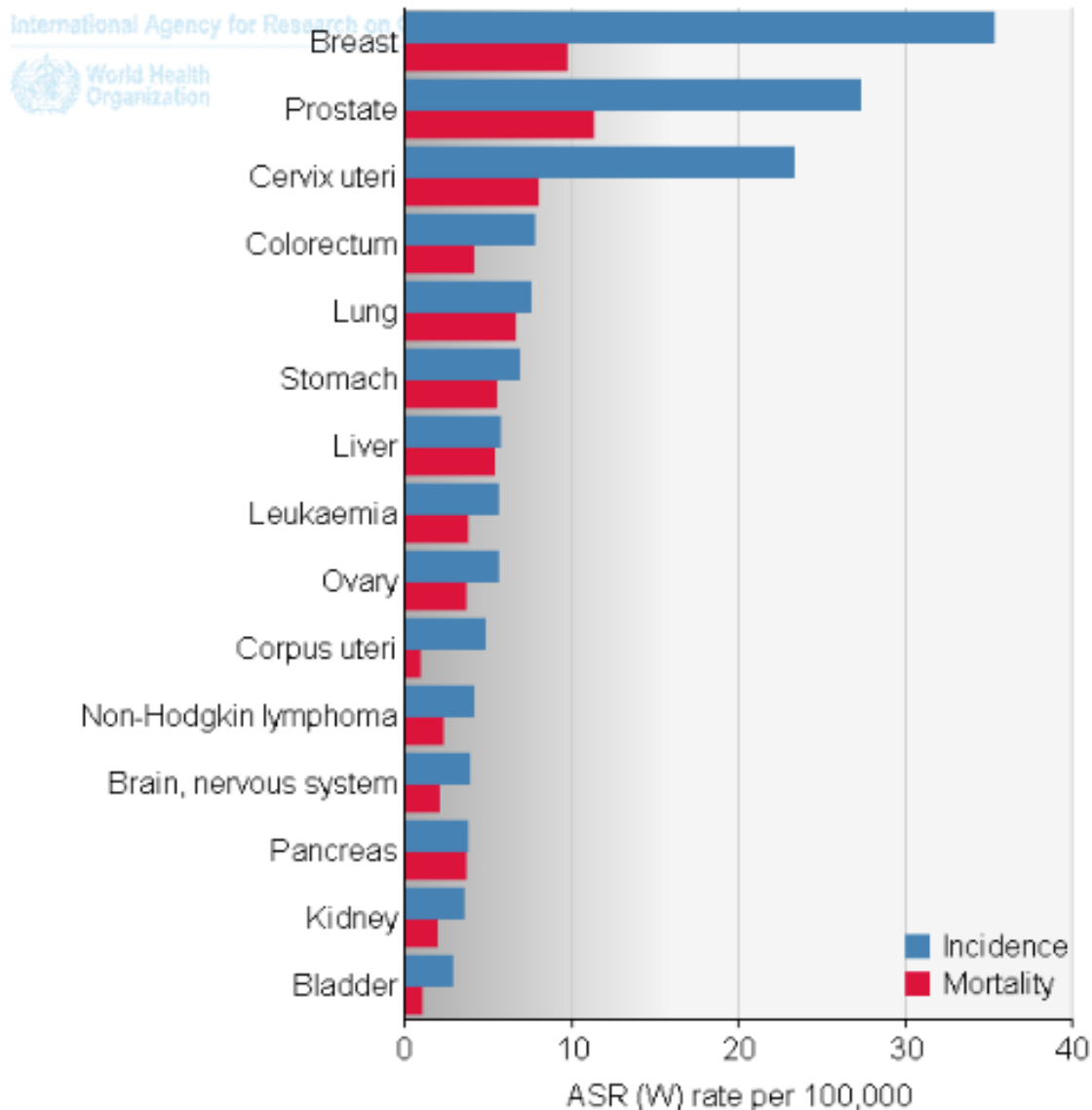


Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en México (ambos sexos). Datos tomados de GLOBOCAN, 2012.

### 2.1 Tratamientos contra el cáncer

El diagnóstico oportuno del cáncer es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz. Cada tipo de cáncer necesita de un tratamiento específico, que puede abarcar una o más modalidades, tales como la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia, buscando como objetivo principal el curar el cáncer o prolongar la



vida de forma considerable del paciente, mejorando su calidad de vida. Otras estrategias en la actualidad son el tratamiento contra el cáncer incluyen a la terapia hormonal, la terapia inmune y las terapias dirigidas (ACS, 2014).

Sin embargo, el tratamiento farmacológico con frecuencia conduce a resultados no satisfactorios con consecuencias fatales para los pacientes, debido a efectos secundarios graves y el desarrollo de resistencia a fármacos. Por lo tanto, la investigación de medicamentos antitumorales constantemente busca mejorar los resultados del tratamiento, para el desarrollo preclínico de nuevos fármacos. (Kuetea *et al*, 2015).

El tratamiento más utilizado es la quimioterapia, la cual consiste en el uso de agentes químicos para eliminar las células cancerosas en proliferación activa. La quimioterapia estándar o tradicional viaja a través del torrente sanguíneo para destruir las células cancerosas en todo el cuerpo, deteniendo su capacidad para crecer y dividirse. Sin embargo, las células normales con mayores probabilidades de ser afectadas son las células productoras de sangre en la médula ósea, así como las células de la boca, del tracto digestivo, del sistema reproductor y los folículos del cabello. La quimioterapia se utiliza frecuentemente después de la cirugía y/o radioterapia para destruir las células cancerosas restantes y reducir el riesgo de recurrencia. Esta modalidad se conoce como adyuvancia. También se puede utilizar la quimioterapia para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía, estrategia conocida como neoadyuvancia, o para tratar el cáncer metastásico o recurrente (ASCO, 2014).

Aunque existe una gran diversidad de agentes quimioterapéuticos, en general los efectos secundarios de la quimioterapia más comunes incluyen: náusea y vómito, caída del cabello, fatiga, aumento de probabilidades de moretones y sangrado, anemia e infecciones (INC, 2015).

Los fármacos utilizados en la quimioterapia se pueden clasificar como específicos del ciclo celular (ECC) y no específicos del ciclo celular (NECC). Los medicamentos NECC (muchos de los cuales se fijan al ADN y dañan a ésta macromolécula) son efectivos en los “tumores sólidos” que tienen una tasa baja de crecimiento, mientras que los ECC han probado ser más eficaces en las

neoplasias hematológicas y en tumores donde existe una proporción grande de células en proliferación (Katzung B., 2003). En 1992 Perry clasificó los agentes quimioterapéuticos de acuerdo a la forma en que dañan al DNA como se puede observar en la siguiente tabla (Perry, 1992).

**Tabla. 1 Clasificación de los fármacos antineoplásicos de acuerdo a un mecanismo de acción (Modificado de Perry, 1992).**

<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Fármaco</b>	<b>Toxicidad (Efectos Adversos)</b>
Alquilación	Mostazas nitrogenadas (Mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, ifosfamida, clorambucil)	Toxicidad pulmonar, amenorrea, esterilidad, azoospemia, atrofia testicular. Rara vez se presenta la alopecia y toxicidad neurológica.
	Nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, clorozotocina)	Mielosupresión severa, daño renal, náusea, vómito, hipofosfatemia, glicosuria, hipercloruremia, toxicidad pulmonar y síndromes mielodisplásicos.
	Otros (tiotepa, hexametilmelamina, busulfan, dacarbazina, mitomicina C, procarbazona)	Vómito, náuseas, cistitis, estomatitis, mucositis, exantema eritematoso y se presenta de manera poco común la toxicidad neurológica
Por enlaces entrecruzados por coordinación con platino	Cisplatino y carboplatino	Nefrotoxicidad, daño gastrointestinal, neuropatías, mielosupresión, hipomagnesemia e infertilidad.
Por inserción en la doble cadena vía topoisomerasa II	Antibióticos (doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, idarubicina, epirubicina y	Alopecia, náusea, vómito, diarrea, anorexia, fiebre, daño a médula ósea, estomatitis,

	amsacrina)	necrosis por extravasación; daño pulmonar, renal, hepático y cardiaco.
	Podofilotoxinas (etoposido y tenoposido)	Mielosupresión, daño gastrointestinal, puede causar un choque anafiláctico, anorexia, diarrea, alopecia y hepatotoxicidad.
Por intercalación que bloquean síntesis de ARN	Dactinomicina y mitramicina	Necrosis por extravasación, trombocitopenia, hipocalcemia, estomatitis, daño renal, hepático, náuseas, vómito y diarrea
Antimetabolitos (inhibidores de enzimas específicas)	Inhibidores de la timidilato sintetasa (5-fluorouracilo, 5-fluoro-2-deoxiuridina)	Daña mucosa intestinal, médula ósea, estomatitis, diarrea, alopecia, dermatitis, hiperpigmentación conjuntivitis y fibrosis, ataxia y somnolencia y toxicidad vascular
	Dihidrofolato reductasa (metotrexate)	Supresión de médula ósea, mucositis, diarrea, daño renal, disfunción hepática, neumonitis y neurotoxicidad.
	Polimerasa de ADN (citarabina)	Supresión de médula ósea, náuseas, vómito, diarrea, estomatitis, elevación de las enzimas hepáticas y ataxia.
	Fosforibosilpirofosfato aminotransferasa (6-mercaptopurina y 6-tioguanina)	Mielosupresión, vómito, diarrea, náuseas y estomatitis.
	Adenosina deaminasa (pentostatina).	Linfotoxicidad, toxicidad hematológica con granulocitopenia y trombocitopenia, inmunosupresión, insuficiencia renal y cardiotoxicidad.
Agentes antihormonales	Tamoxifeno, aminoglutatimida, leuprolda, flutamida.	Toxicidad ocular, cerebro, cerebelo, atrofia del hipocampo y

		hepatotoxicidad.
Agentes hormonales	Estrógenos, andrógenos, progestinas corticoesteroides	Toxicidad cardiovascular, pulmonar y hepatotoxicidad.
Modificadores de la respuesta biológica	Citocinas (Interleucina), BCG (Bacillus Calmette Guerin) y levamisol	Toxicidad pulmonar, mielotoxicidad , hematuria y leucopenia,

Dentro de las diferentes estrategias del tratamiento del cáncer destaca el uso del cisplatino, por ser uno de los agentes quimioterapéuticos más efectivos y utilizados contra diferentes tipos de neoplasias, como las de vejiga, cuello uterino, esófago, cabeza, cuello, ovario y testículo (Lebwohl y Canetta, 1998). Sin embargo, a pesar de su alta eficacia terapéutica, su principal limitante es su alta nefro- y ototoxicidad, las cuales se observan hasta en un 25-30% de pacientes tratados y obligan a detener o suspender el tratamiento (Chirino y Pedraza, 2009; Daugaard y Abildgaard, 1989). Entre los diferentes efectos secundarios del cisplatino figuran el vómito, desorden en el tracto digestivo, anemia, disminución en la cuenta de glóbulos blancos y de la concentración de  $Mg^{+}$ ,  $K^{+}$  y  $Ca^{+}$  en sangre (ACS, 2014). Por lo anterior existe la necesidad de encontrar nuevos agentes antitumorales con mayor margen de seguridad y efectividad.

### 3.1 Tiosemicarbazonas

Las tiosemicarbazonas son compuestos derivados de aldehídos o cetonas sintetizadas a partir de tiosemicarbazidas, mediante la formación de un enlace covalente entre la amina primaria de la tiosemicarbazida y el grupo carbonilo de un aldehído o cetona, con la pérdida de una molécula de agua. La estructura general de estas moléculas se puede observar en la (Figura. 3), la cual presenta un análogo de una semicarbazona que contiene un átomo de azufre en lugar del átomo de oxígeno (McMurry, 2012).

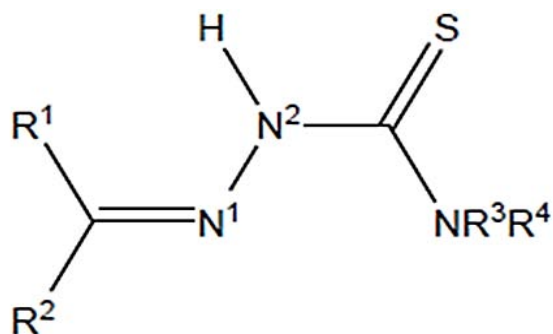


Figura. 3 Estructura general de las tiosemicarbazonas

La síntesis de las tiosemicarbazonas (TSC) es un proceso reversible y requiere de la eliminación de una molécula de agua para dar origen al enlace imino (Beraldo, 2004). Las tiosemicarbazonas son ligandos muy versátiles gracias a la existencia de átomos de nitrógeno y azufre con pares electrónicos susceptibles de ser donados, logrando coordinarse a los metales como moléculas neutras o después de la desprotonación, como ligandos aniónicos y pueden adoptar una amplia variedad de diferentes modos de coordinación (Beraldo, 2004).

#### 4.1 Actividad Biológica

Los primeros datos sobre el uso potencial de TSC como agentes terapéuticos provienen de los estudios de Dogmak et al, cuyo grupo describió en 1946 la actividad de estas moléculas en modelos *in vitro* frente a retos con *Mycobacterium tuberculosis* (TB) (Dogmak, 1946). Desde entonces se han realizado distintos ensayos experimentales buscando actividad biológica de las tiosemicarbazonas, donde Campbell en 1975 descubrió un efecto antiinflamatorio (Campbell, 1975). En 1982 Pfau, encontró que la p-acetamidobenzaldehído tiosemicarbazona era activa frente a virus de la familia *poxviridae* (Pfau, 1982). Posteriormente Jursic y Neumann en 2001, obtuvieron tiosemicarbazonas a través de una reacción de condensación con un derivado del ácido barbitúrico, y mostraron la inhibición en el crecimiento de bacterias y hongos a través del envenenamiento por los grupos sulfhidrilo (Jursic y Neumann, 2001). Finalmente en 2004, Beraldo y Gambino corroboraron el efecto antiviral de algunas TSC y demostraron sus efectos antibacterianos, antifúngicos y antineoplásicos (Beraldo y Gambino, 2004).

En el 2004 y 2005 en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, en la actividad antiparasitaria de algunas TSC's en protozoarios como *Plasmodium berghei* y *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* donde la actividad de las tiosemicarbazonas contra estos parásitos ocurre mediante la inhibición de las cisteína proteasas falcipaína-2, rodesina y cruzaina de cada protozoo. La inhibición de estas enzimas bloquea el ciclo celular de estos parásitos en células infectadas de mamíferos (Greenbaum *et al*, 2004 y Fujii *et al*, 2005). Algunas TSC también han demostrado poseer actividad *in vitro* contra el protozoo *Entamoeba histolytica*, que provoca disentería amebiana. Tal es el caso de los derivados del 2-carboxaldehído tiosemicarbazonas con grupos tiofeno o nitrofurano, junto con los complejos de Palladio (II), gracias a la actividad quelante de estos grupos (Shailendra *et al*, 2003, Bharti *et al*, 2004 y Sharma *et al*, 2005). Diversas investigaciones sobre la actividad biológica de las TSC han demostrado un amplio intervalo de aplicaciones para estos compuestos con actividad antifúngica, antibacteriana, antitumoral, en modelos *in vitro*. Las TSC heterocíclicas ejercen su acción biológica en células de mamíferos inhibiendo la ribonucleótido reductasa, una enzima clave en la síntesis de precursores de ADN, donde en muchos casos la actividad biológica de las TSC con coordinados metálicos tiene mayor actividad inhibitoria que la de las tiosemicarbazonas sin coordinados (Greenbaum *et al*, 2004).

En este sentido, estudios previos realizados por Antholine y colaboradores propusieron utilizar complejos de  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  con TSC y se encontró que su actividad era mayor que la del ligando libre (Antholine *et al*, 1976). Estudios posteriores realizados por Klayman y colaboradores en 1979 sobre las TSC han puesto de manifiesto que estas moléculas poseen también propiedades antimaláricas (Klayman *et al*, 1979). En 1985 Thimmaiah y su equipo de trabajo identificaron efectos antifúngicos de algunos derivados de TSC (Thimmaiah *et al*, 1985). Collins y colaboradores en 1982 encontraron similitud en la sensibilidad de TB y *Mycobacterium leprae* al derivado de TSC 2-acetilpirimidina tiosemicarbazona, proponiendo que su actividad se debe a su gran capacidad quelante (Collins *et al* 1982). Además los coordinados de tiosemicarbazonas

demostrado actividad antifúngica cuando están en forma de complejo con metales de transición en estado de oxidación (II), tales como hierro, cobalto, níquel y cobre (Thimmaiah et al, 1985). En 1981 Saryan y colaboradores encontraron que complejos de TSC con hierro y cobre son más activos en contra de las células de carcinoma de ratón y en la inhibición de la síntesis del ADN que las TSC libres (Saryan et al, 1981). West y su grupo de trabajo en 1993 comprobaron que los complejos de  $\text{Cu}^{+2}$  de tiosemicarbazonas heterocíclicas presentan una mayor inhibición del crecimiento fúngico sobre *Aspergillus niger* que los complejos de  $\text{Ni}^{+2}$  (West et al, 1993). Estudios *in vitro* con tiosemicarbazonas complejadas con  $\text{Ga}^{+3}$  demostraron actividad contra el virus Rauscher de leucemia murina, mediada por la inhibición de la reverso transcriptasa viral (Waalkes, 1974 y Kratz, 1991).

Uno de los primeros mecanismos propuestos fue en 1991 propuesto por West y colaboradores explicaron que la subunidad no hemo del hierro se revela inactiva por la acción de algunas TSC, probablemente debido a la coordinación del hierro por parte de un ligando tridentado N, N, S, o también a la complejación del ligando libre con el hierro de la enzima. Los estudios de complejos de hierro y cobre han puesto de manifiesto que podían ser más activos en la destrucción celular y en la inhibición de la síntesis del ADN que las tiosemicarbazonas sin complejar. Además, en el caso de la 5-hidroxi-2-formiltiosemicarbazona, se pudo comprobar que originaba lesiones en el ADN. Estas observaciones supusieron en su momento un importante avance en la síntesis de un elevado número de complejos de metales de transición con 2-heterociclo TSC y también con los llamados S-alquilditiocarbamatos (West et al, 1991).

En el año 2003 Van Moorsel mostró un mecanismo de acción que involucra la inhibición de la ribonucleotido reductasa (RNR), la enzima responsable de catalizar la reducción de ribonucleótidos a sus correspondientes desoxirribonucleótidos esenciales para la síntesis de ADN y la reparación de daños a ADN; la inhibición de RNR conduce a una disminución celular de los desoxinucleósidos trifosfato (dNTP) (Van Moorsel et al, 2003).

Posteriormente Shao en 2006 propuso que estas moléculas inhibidoras quelan el radical tirosilo y el  $\text{Fe}^{2+}$  del centro activo de la ribonucleotido reductasa (RNR),

impidiendo la síntesis de los ribonucleótidos necesarios para la replicación del DNA (Shao *et al*, 2006).

Sigmond en 2007 se refería a RNR como un tetrámero constituido por dos homodímeros no idénticos. Las dos subunidades idénticas M2 regulan la especificidad del sustrato de la enzima, mientras que las otras dos subunidades idénticas M1 son responsables de la actividad de unión de los ribonucleótidos y efectores alostéricos. Existen dos tipos de RNR con dos homólogos M2 diferentes: la forma p53 independiente (hRRM2), vinculada con el ciclo celular, mecanismos de control del crecimiento; y la forma p53 dependiente (p53R2), que forma un complejo con p53, el cual posiblemente esté implicado en la reparación del ADN, tanto en células proliferantes como en reposo. Por lo tanto P53 puede interactuar con p53R2 y hRRM2 a nivel de proteína para regular la actividad de RNR (Sigmond *et al*, 2007).

En 2009 Kalinowski demostró la capacidad de las TSC de formar complejos de Fe que generaran especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales catalizan el daño oxidativo a varias biomoléculas como proteínas, lípidos, y el DNA, y tienen un papel importante en los efectos antiproliferativos (Kalinowski, 2009), Asimismo, en 2012 Yalowich y colaboradores proponen otro mecanismo de acción el cual involucra la inhibición de la topoisomerasa II $\alpha$  (Yalowich, 2012).

### **5.1. Actividad antitumoral**

Uno de los primeros ensayos en donde se describió la actividad antitumoral de las TSC se realizó en 1956 por Brockman y colaboradores, en el que descubrieron que la 2-formilpiridina TSC era activa contra las células de leucemia L210, L82T y L4946 en ratones (Brockman *et al*, 1956).

En 1970, French y colaboradores encontraron derivados de TSC con actividad anticancerígena, los cuales incluyen las glioxal bis-TSC, las N-heterociclo tiosemicarbazonas, la 2-formil-3-hidroxipiridina tiosemicarbazona y la 2-formil-5-hidroxipiridina tiosemicarbazona. Un importante avance en el estudio de la actividad antitumoral de estos compuestos ha sido que la 1-formil isoquinolina tiosemicarbazona presenta actividad contra una gran variedad de tumores de



ratones, siendo un potente inhibidor de la síntesis del ADN (French, 1970). Este efecto también se observa a nivel de el ARN y en la síntesis de proteínas. En ese mismo trabajo se encontró que el hierro está implicado en la inhibición de la síntesis de ADN y que la ribonucleótido difosfato reductasa (RDR) tiene una gran afinidad por este mismo (French, 1970).

García y colaboradores en 1989, proponen que la acción antitumoral de los complejos metálicos con tiosemicarbazonas puede interpretarse a partir de uno de los siguientes mecanismos de reacción:

Inhibición de la ribonucleótido reductasa (RNR) mediante la coordinación de la tiosemicarbazona al hierro (II) que es el centro activo. Este mecanismo implicaría una disociación del complejo para liberar una molécula de tiosemicarbazona con una estereoisomería adecuada para bloquear el centro activo de la RNR.

Oxidación de la tiosemicarbazona al correspondiente 2-amino-1, 3,4-tiadiazol por efecto de la reducción del metal. Este mecanismo concuerda con el hecho de que sean los complejos de cobre y cobalto los de mayor citotoxicidad.

Interacción del complejo metálico, mediante procesos redox, con el radical superóxido u otro radical importante biológicamente hablando. Este mecanismo permitiría explicar la mayor citotoxicidad de los complejos de cobre puesto que, en algunos compuestos de este metal, se ha observado su acción dismutante sobre el radical superóxido (García *et al*, 1989).

Liu y colaboradores en 1992, encontraron que cada vez son más las tiosemicarbazonas que muestran ser potentes citotóxicos inhibiendo el crecimiento de células leucémicas en humanos (Liu *et al*, 1992), encontrado entre los años 1995 y 1997 que muchas de ellas poseen actividad antitumoral (Liu *et al*, 1995 y Rodríguez *et al*, 1997). La mayoría se han estudiado también TSC coordinadas con cobre y algunas, como la 5-formiluracil tiosemicarbazona estudiada por West y colaboradores en 1993 (West *et al*, 1993) siendo capaces de inducir apoptosis. En el año 1994 se demostró que incluso complejos *trans* son activos, contradiciendo la generalización usual de que la estructura *cis* es un requisito

previo para la actividad antitumoral de los complejos de platino (Kelland *et al*, 1994).

Ya que muchos ensayos de TSC con complejos metálicos, los complejos con cobre son los que más atención han despertado ya que, además de que poseen actividad contra el cáncer, presentan actividad contra infecciones, úlceras, convulsiones entre otras. Dichas propiedades son debidas a sus características redox y a su acción a través del radical superóxido dentro de la célula estudiado por Kovala-Demertzi y colaboradores (Kovala-Demertzi *et al*, 1997).

En 1997 se realizaron estudios de complejos metálicos por Kovala-Demertzi donde se evaluó su actividad antitumoral contra células leucémicas P388 de manera *in vivo* (Kovala-Demertzi *et al*, 1997), posteriormente sintetizó complejos de paladio y platino con TSC, los cuales poseen actividad antitumoral (Kovala-Demertzi *et al*, 2007)

En la mayoría de los casos estas TSC con coordinados metálicos actúan inhibiendo la síntesis de la purina, la IMP deshidrogenasa y la  $\alpha$ -ADN polimerasa estudiada por Miller y colaboradores (Miller *et al*, 1998).

En 1998, Miller y colaboradores y el equipo de trabajo de Quiroga estudiaron la actividad antitumoral de complejos de paladio (II) y platino (II) en el intercambio de cromátidas hermanas en la cinética de proliferación de linfocitos en ratas y humanos, así como contra la leucemia P38882 y en células tumorales resistentes al cisplatino (Miller *et al*, 1998).

En los estudios de Jursic y Neumann en 2001 se encontró que una de las causas que podrían mostrar propiedades anticancerígenas y a los que muchos autores les atribuían, son las bases de Schiff derivadas de ácidos 5-acilbarbitúricos (Jursic y Neumann, 2001).

Actualmente un fármaco derivado de estas tiosemicarbazonas, es la Triapina (3-Aminopyridine-2-carboxaldehyde tiosemicarbazona) Fig 4, el cual fue utilizado en el Instituto Nacional del Cáncer, E.U.A. en el año 2000 por primera vez en pacientes con tumores sólidos inespecificos obteniendo buenos resultados, lo que llevo a que se realizaran alrededor de 33 estudios clínicos en fase I y II de cáncer de mama, próstata, pulmón, riñón y cervical (Shao *et al*, 2006., Finch *et al*, 1999 y

2000 y Wadler *et al*, 2004), demostrando ser un fármaco efectivo, lamentablemente los pacientes tratados con este agente presentaron efectos secundarios importantes como disnea, leucopenia, neutropenia, metahemoglobinemia e hipoxia, los cuales han detenido su avance en varios estudios clínicos y ha motivado diferentes esfuerzos para sintetizar derivados de tiosemicarbazonas con mejor margen terapéutico y actividad antitumoral (Knox *et al*, 2007 y Kalinowski *et al*, 2009).

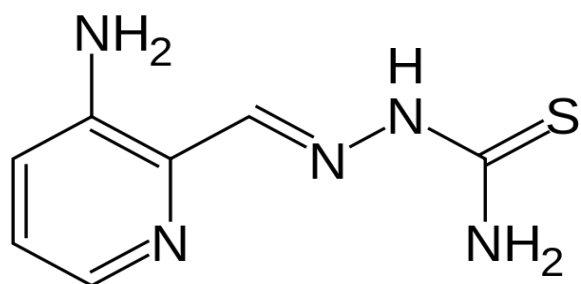


Figura. 4 Estructura de la Triapina

## 2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. La OMS señala que en 2008, fallecieron 7.6 millones de personas, y estima que para 2030, esta cifra aumentará a 13.1 millones de casos. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) señala que en la región de las Américas fallecieron 1.2 millones de personas en 2008 por cáncer. En México, de acuerdo con la UICC, el cáncer es la tercera causa de muerte y se estima que cada año se detectan 128 mil nuevos casos. En este sentido el estudio y caracterización de nuevas moléculas con potencial antitumoral es una necesidad de gran relevancia. En este trabajo se analizó la inhibición de la viabilidad de siete compuestos derivados de TSC en dos modelos *in vitro*, utilizando como referencia el cisplatino, un agente quimioterapéuticos de los más utilizados.

### **3. HIPÓTESIS**

Los compuestos derivados de las tiosemicarbazonas inhibirán la viabilidad celular en las líneas de cáncer de mama MDA-MB 231 y MCF7, y en combinación con el cisplatino tendrán un mayor efecto inhibitorio que por separado.

## **4. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la inhibición de la viabilidad de siete compuestos derivados de tiosemicarbazonas en los modelos *in vitro* de cáncer de mama MDA-MB231 y MCF7, y comparar contra el fármaco de referencia cisplatino.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Realizar ensayos de viabilidad celular en las líneas MDA-MB-231 y MCF7.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de todos los siete compuestos derivados de tiosemicarbazona en las líneas de cáncer MDA-MB231 y MCF7, comparándolas con las del cisplatino.
- Realizar ensayos de combinación cisplatino- TSC (TSC1, 5 y 7) en la línea celular MCF7.

## 5. METODOLOGÍA

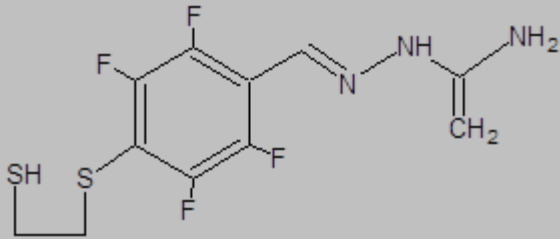
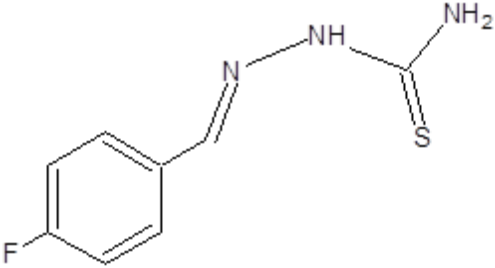
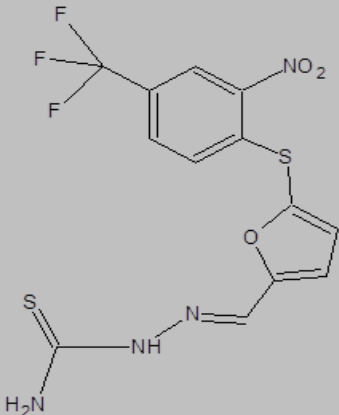
### 5.1. Síntesis de tiosemicarbonas

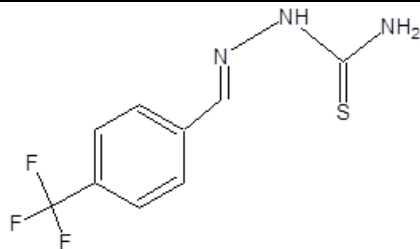
En el presente estudio se emplearon 7 compuestos derivados de tiosemicarbonas sintetizados por el equipo de trabajo de la Dra. Adriana Moreno Rodríguez en la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca (UABJ), Oaxaca, como se describe en el ANEXO. La pureza de estos compuestos fue >99%.

#### 5.1.1 Estructuras químicas de las tiosemicarbonas

Se muestran en la siguiente tabla los derivados de TSC sintetizados por el grupo de trabajo de la Dra. Adriana Moreno.

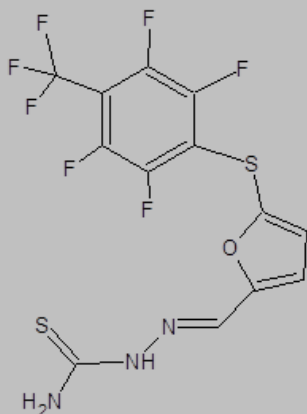
Tabla 2. Estructura química de los 7 compuestos derivados de tiosemicarbonas utilizados.

Estructura	Compuesto
	TSC 1 4,4'-(Etano-1,2-Disulfanodil)-Bis (2,3,5,6-tetrafluorobenzaldehído) tiosemicarbona
	TSC 2 4-fluorobenzaldehído tiosemicarbona
	TSC 3 5-[(2-nitro-4 (trifluorometil)fenil)tio]-2- furaldehído tiosemicarbona



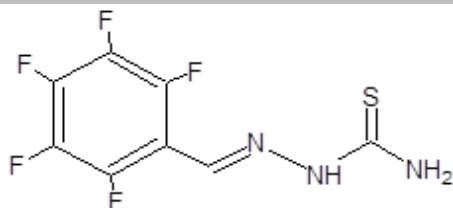
TSC 4

4-(trifluorometilbenzaldehído)  
tiosemicarbazona



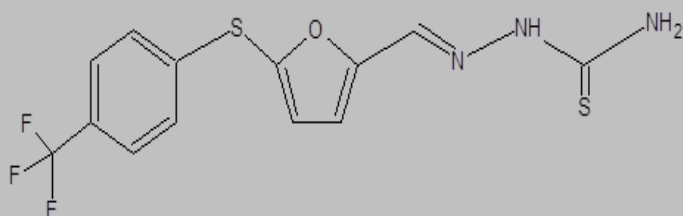
TSC 5

5-[(2,3,5,6-tetrafluoro-4[trifluorometil]  
fenil)tio]-2-furaldehído  
tiosemicarbazona



TSC 6

2, 3, 4, 5, 6,-pentafluorobenzaldehído  
tiosemicarbazona



TSC 7

5-[4-(trifluorometil)feniltio]-2-  
furaldehído tiosemicarbazona

## 5.2. Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7, las cuales se cultivaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> al 5%, utilizando el medio DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino.

Las células se descongelaron (Pase 8) y se sembraron en una caja T25 y se dejaron que alcanzaran una confluencia de un 85-90%, se le cambio el medio DMEM F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino cada 48 horas. Al



alcanzar una confluencia del 90% se tripsinizaron y se sembraron 10,000 células por pozo en una placa de 96 pozos de fondo plano (32 pozos por placa).

### **5.3. Viabilidad celular**

Las células se sembraron en placas de 96 pozos fondo plano con un tiempo de adherencia de 6 horas y se realizó una curva de concentración-respuesta, incubando a las siguientes concentraciones 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de los 7 compuestos así como del cisplatino durante 24 y 48 horas. Se utilizó como control medio de cultivo suplementado con 10% de FBS+DMSO 2% y para cisplatino se utilizó solo medio de cultivo. Se evaluó la viabilidad celular por el método de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), midiendo los cambios de absorbancia a 570 nm. Se calculó la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) de cada compuesto así como del cisplatino. Se realizaron 4 repeticiones por concentración en cada línea celular en 3 experimentos independientes. Se realizó una curva de concentración-respuesta con el cisplatino a las mismas concentraciones de los compuestos en las dos líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7 a 24 y 48 horas.

### **5.4. Análisis estadístico**

Para identificar diferencias estadísticas significativas en los efectos de los fármacos sobre la viabilidad celular, se empleó la prueba estadística ANOVA de una vía, seguido por una prueba de Bonferroni, con una significancia mínima de  $P < 0.05$ . Para los cálculos de la  $\text{CI}_{50}$  se realizaron en el programa BIOSTAT por el método de PROBIT para ensayos de viabilidad.

## 5.5 Ensayo de combinación cisplatino-TSC

Se sembraron células MCF7 (10, 000 células por pozo) en una placa de 96 pozos fondo plano con un tiempo de adherencia de 6 horas y se aplicaron 3 tratamientos de combinación de cisplatino y con los compuestos seleccionados (TSC1, TSC5 y TSC7), el tratamiento A (Cisplatino 40  $\mu$ M por 2 horas+ TSC 40  $\mu$ M por 22 horas), el tratamiento B (Cisplatino 40  $\mu$ M por 2 horas+ TSC 80  $\mu$ M por 22 horas) y el tratamiento C (Cisplatino 80  $\mu$ M por 2 horas+ TSC 80  $\mu$ M por 22 horas) con sus respectivos controles, células con medio DMEM-F12 suplementado con FBS al 10%, células con medio suplementado al 10%; con las concentración utilizada de cisplatino 40 y 80  $\mu$ M y células con medio suplementado al 10%+ DMSO al 2%; con las concentraciones utilizadas de TSC 40 y 80  $\mu$ M. Se realizaron 4 repeticiones por concentración con sus respectivos controles en 3 experimentos independientes, para conocer la disminución de la viabilidad celular se utilizó el método de MTT, para conocer el porcentaje de disminución de la viabilidad celular posteriormente se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía seguido de una prueba Bonferrioni para conocer si existen diferencias significativas de los tratamientos en cuanto al control sin tratamiento y a los respectivos controles (Cisplatino y TSC a 40 y 80  $\mu$ M).

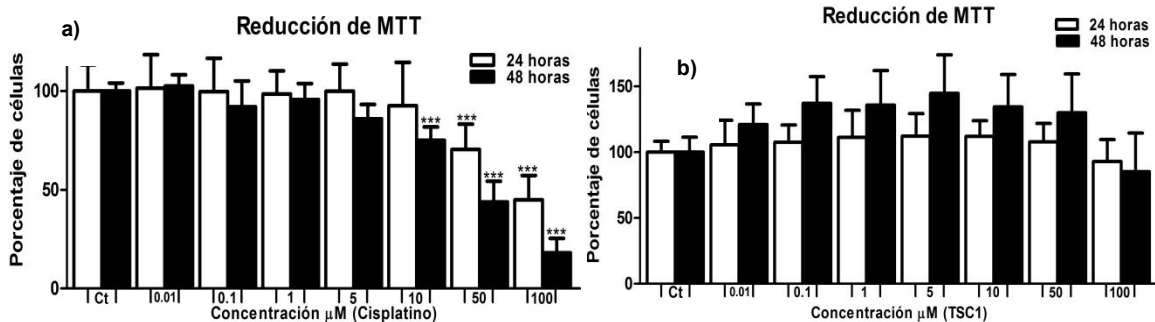
## **6.-RESULTADOS**

### **6.1 Viabilidad celular**

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inhibición de la viabilidad celular se utilizó el método de MTT en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7. Se probaron los 7 compuestos derivados de las TSC con un control negativo (medio de cultivo + DMSO 2%), con cisplatino y con su respectivo control (medio de cultivo), a diferentes concentraciones, abarcando desde 0.01 a 100  $\mu\text{M}$ , en tres experimentos independientes, a 24 y 48 horas, como se muestra a continuación (Figuras 5-12).

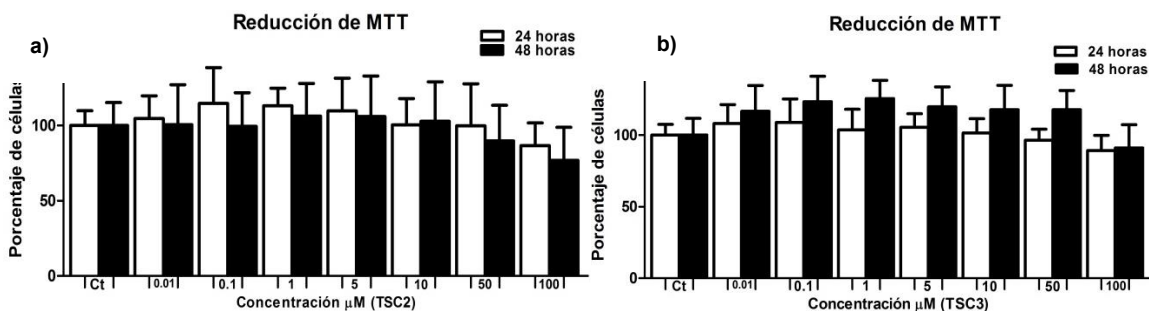
#### **A) MDA-MB-231**

De los tres experimentos independientes (n=3) se obtuvieron las gráficas de reducción de MTT para los 7 compuestos derivados de las tiosemicarbazonas y para el fármaco de referencia cisplatino. Se realizó el análisis estadístico Anova para identificar diferencias significativas de una vía (ver métodos). En el experimento con cisplatino se observó una inhibición significativa de la viabilidad a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$  a las 48 h ( $P < 0.001$ ), con una inhibición de 25%. A la concentración de 50  $\mu\text{M}$  se observó una inhibición de 29.49 y 56.17% para 24 y 48 h ( $P < 0.001$ ), respectivamente. A la concentración de 100  $\mu\text{M}$  se observó una inhibición de 55.09 y 81.92% para 24 h y 48 h ( $P < 0.001$ ), respectivamente (Figura 5a).

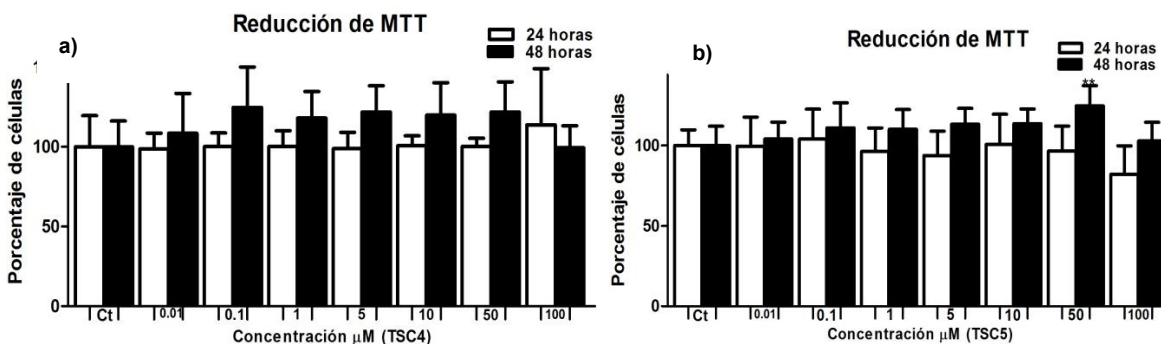


**Figura 5.** Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de cisplatino (A) y TSC1 (B) a 24 y 48 horas. N= 3. \*\*\*: P <0.001.

En los experimentos con las TSC1, TSC2, TSC3, TSC4, TSC5, TSC6, TSC7 no se observó actividad sobre la disminución de la viabilidad en las condiciones antes mencionadas, por cual se concluye que esta línea no fue sensible a las TSC empleadas en este trabajo (Figuras 5b, Figuras 6-8).



**Figura 6.** Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  TSC 2 (A) y TSC 3 (B) a 24 y 48 horas.



**Figura 7.** Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  TSC 4 (A) y TSC 5 (B) a 24 y 48 horas. \*\*: P < 0.01.

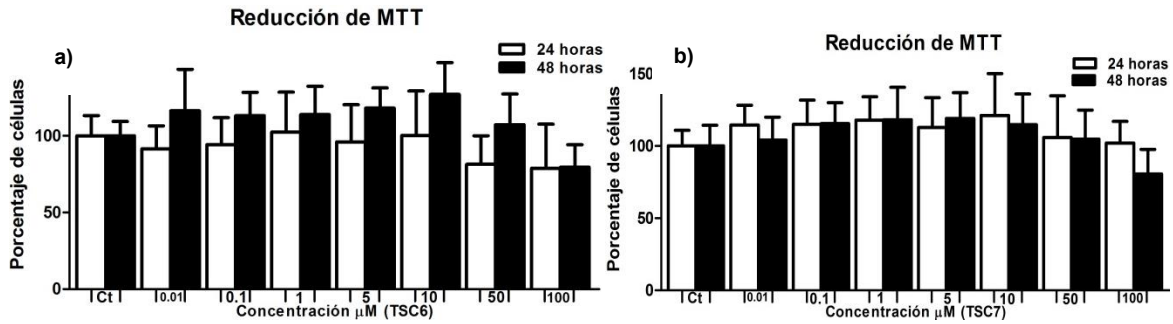


Figura 8. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MDA-MB-231, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100 μM TSC 6 (A) y TSC 7 (B) a 24 y 48 horas.

### B) MCF-7

Para evaluar el efecto de las TSC sobre la viabilidad en la línea celular de cáncer de mama MCF7, se realizó la misma metodología y condiciones descritas previamente para la línea celular MDA-MB-231. Los resultados se muestran en las Figuras 9-12.

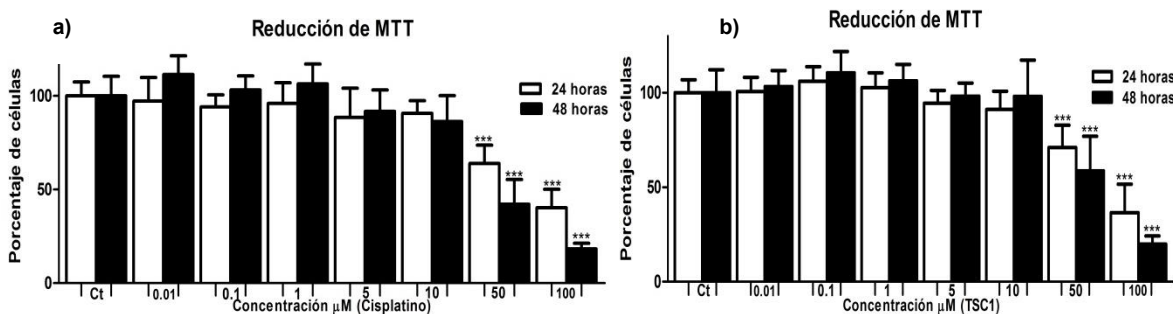


Figura 9. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100 μM de cisplatino (A) y TSC1 (B) a 24 y 48 horas. \*\*\*: P < 0.001.

Se encontró un efecto significativo ( $P < 0.001$ ) en el tratamiento con cisplatino a 50 μM, con un porcentaje de inhibición de 36.09% y 57.89% a 24 y 48 h, respectivamente. A 100 μM se presentó un porcentaje de inhibición de 59.72 % y 81.76 % a 24 y 48 h, (Figura 9a). La TSC1 mostró un efecto inhibitorio a partir de 50 μM, con porcentajes de inhibición de 28.96% y 41.30% a 24 y 48 h. A 100 μM

el efecto inhibitorio alcanzó 63.44% y 80.10% a 24 y 48 h (Figura 9b). Estos efectos son similares a los provocados por el cisplatino.

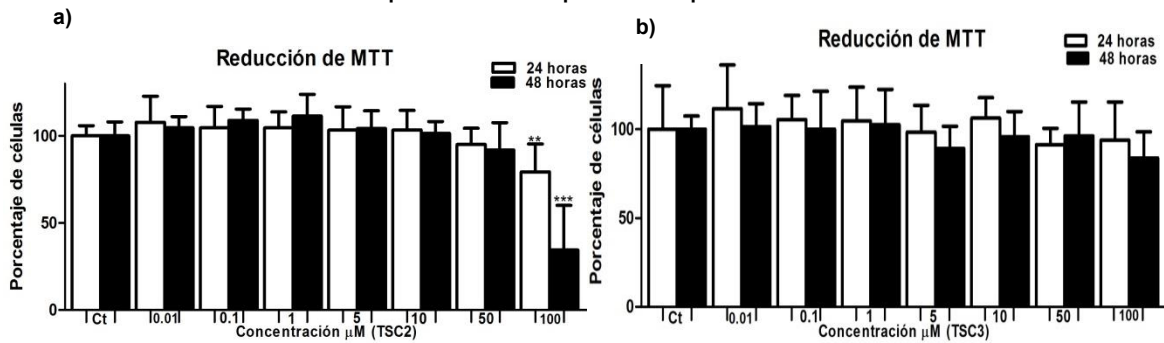


Figura 10. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100 µM TSC 2 (A) y TSC 3 (B) a 24 y 48 horas. \*\*: P < 0.01; \*\*\*: P < 0.001.

La TSC2 mostró efecto inhibitorio a 100 µM, con 20.66 y 65.55% de inhibición a 24 y 48h, respectivamente (Figura 10a). Las TSC3 y TSC4 no presentaron efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular (Figuras 10b y 11a).

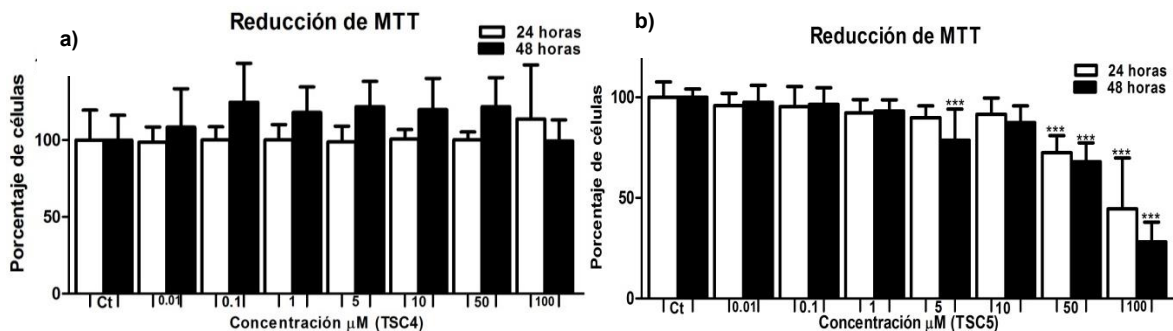


Figura 11. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100 µM TSC 4 (A) y TSC 5 (B) a 24 y 48 horas. \*\*\*: P < 0.001.

La TSC5 redujo la viabilidad a 5 µM (21.34% de inhibición) a 48 horas, sin embargo este efecto no se mantuvo en la concentración de 10 µM. A partir de 50 µM esta TSC inhibió la viabilidad en 27.59 y 32.05% a 24 y 48 h, respectivamente. A 100 µM el efecto alcanzó 55.44 y 71.89% a 24 y 48 h (Figura 11b).

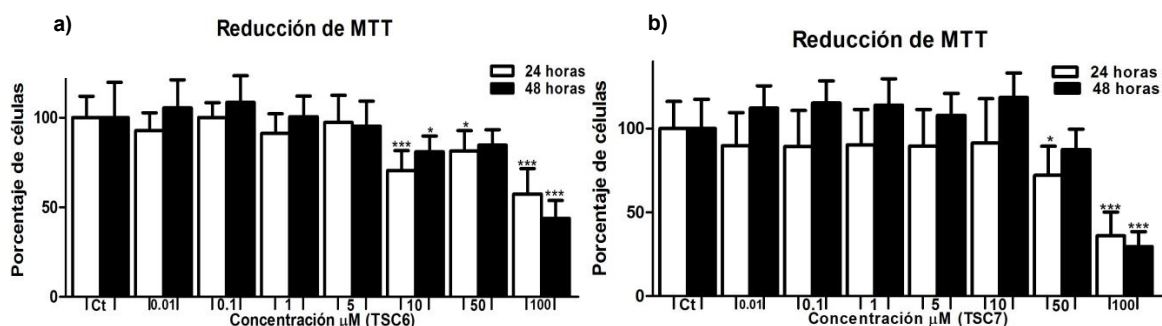


Figura 12. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento y a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  TSC 6 (A) y TSC 7 (B) a 24 y 48 horas. \*:  $P < 0.1$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

La TSC6 mostró un porcentaje de disminución en la viabilidad a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de 29.38 y 19% a 24 y 48 h. A 50  $\mu\text{M}$  mostró una disminución de 18.64% a 24 h. Finalmente a 100  $\mu\text{M}$  a inhibición fue de 42.69 y 56.21% a los tiempos de 24 y 48 h (Figura 12 a). La TSC7 disminuyó la viabilidad un 28.01% a la concentración de 50  $\mu\text{M}$  a 24 h; a 100  $\mu\text{M}$  se disminuyó un 64.03 y 70.39% a 24 y 48 h respectivamente (Figura 12b).

Al finalizar estos ensayos de viabilidad celular la TSC1 a 100  $\mu\text{M}$  en el tiempo de 48 h mostró el porcentaje de inhibición más alto (80.10%) que las seis TSC empleadas, sin embargo no fueron mayores al cisplatino (81.76 % ), pero estos valores de disminución en la viabilidad son muy cercano y pueden ser comparables.

## 6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ).

Al finalizar los ensayos de viabilidad celular se calculó la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), un indicador de la concentración que disminuye la viabilidad al 50%, para las siete TSC y el cisplatino en las dos líneas celulares empleadas, a 24 y 48 h. El valor de  $CI_{50}$  del cisplatino fue de 87.90  $\mu\text{M}$  y de 53.38  $\mu\text{M}$  para MDA-MB-231 a las 24 y 48h, respectivamente. En la línea celular MCF7 estos valores fueron 80.42  $\mu\text{M}$  y 57.59  $\mu\text{M}$  (Tabla 3).

De los 7 compuestos evaluados en la línea celular MDA-MB-231 no se observaron valores de inhibición comparables o menores a los del cisplatino, sin embargo en la línea celular MCF-7 las TSC con valores de  $CI_{50}$  similares al cisplatino a 24 h (80.42  $\mu$ M) fueron las TSC7 (80.69  $\mu$ M), TSC1 (81.34  $\mu$ M) y TSC5 (89.94  $\mu$ M) en MCF7 mientras que a las 48 horas las TSC no mostraron valores comparables contra el cisplatino (57.59  $\mu$ M).

**Tabla 3. Concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) de los compuestos evaluados en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF7.**

Línea Celular	Compuesto	$CI_{50}$ 24 horas ( $\mu$ M)	$CI_{50}$ 48 horas ( $\mu$ M)
<b>MDA-MB-231</b>	<b>Cisplatino</b>	87.90	53.39
	TSC1	Fuera de intervalo	185.67
	TSC2	200.09	Fuera de intervalo
	TSC3	Fuera de intervalo	140.93
	TSC4	Fuera de intervalo	Fuera de intervalo
	TSC5	173.76	Fuera de intervalo
	TSC6	159.02	161.17
	TSC7	Fuera de intervalo	165.20
<b>MCF-7</b>	<b>Cisplatino</b>	80.42	57.59
	TSC1	81.34	67.44
	TSC2	152.36	88.32
	TSC3	225.13	177.51
	TSC4	223.77	202.22
	TSC5	89.94	70.18
	TSC6	104.81	91.62
	TSC7	80.69	83.85



### 6.3 Ensayo de combinación cisplatino-TSC

Debido a que en la línea celular MCF7 los compuestos TSC1, TSC5 y TSC7 obtuvieron un valor de  $CI_{50}$  similar al de cisplatino a 24 h, como se observa en la (tabla 3), se decidió realizar ensayos de combinación de estas TSC con el cisplatino a 24 h. Para evitar una posible interacción entre cisplatino y las TSC, en los pozos donde se combinaron los fármacos, se realizó una incubación con cisplatino a 40 y 80  $\mu\text{M}$  por 2 h, previa al tratamiento con las TSC. Después se lavaron los pozos con PBS y se realizó la exposición con cada TSC por 22 h, para que en suma se alcanzaran 24 h.

#### A) Cisplatino-TSC1

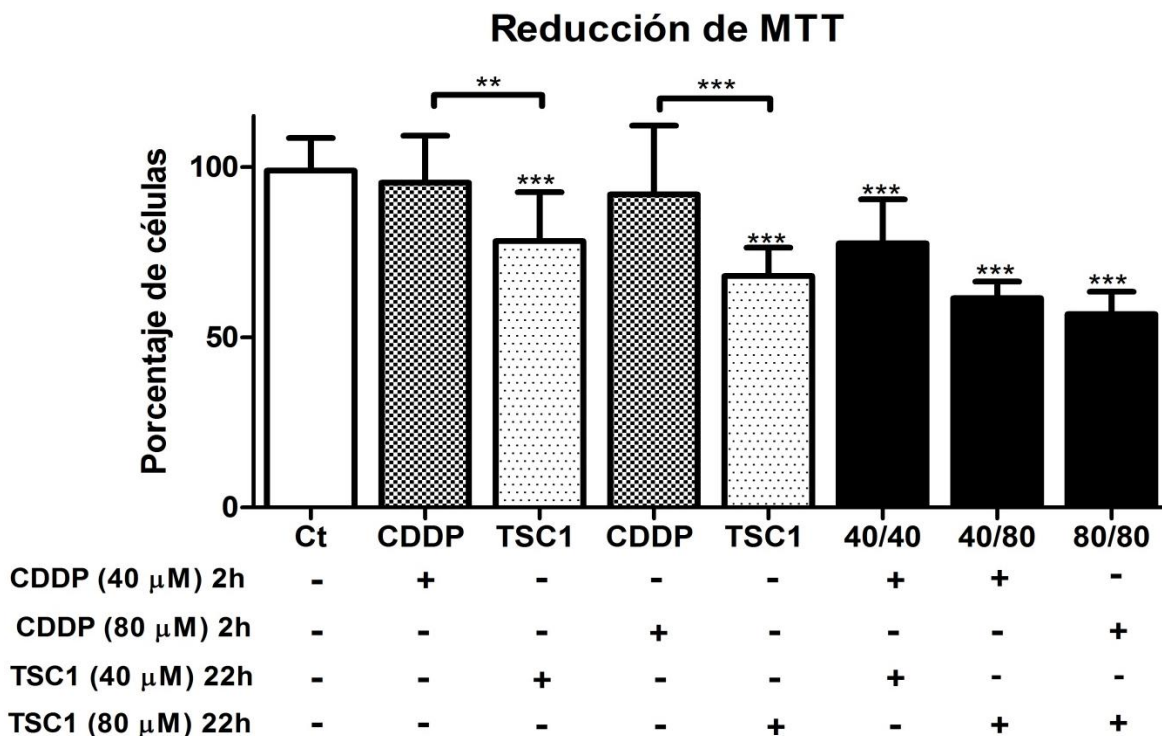


Figura 13. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu\text{M}$ , (TSC1 40) TSC1 a 40  $\mu\text{M}$ , (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu\text{M}$ , (TSC1 80) TSC1 a 80  $\mu\text{M}$ , (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

Las células expuestas a TSC1 disminuyeron su viabilidad a la concentración de 40  $\mu\text{M}$  (21.71%), 80  $\mu\text{M}$  (32.02%) de TSC1, y en los tratamientos combinados con

cisplatino 40/40 (22.46%), 40/80 (38.54%) y 80/80 (43.26%) en relación al control (Ct). Sin embargo, la exposición a TSC1 por 22h no mostró diferencias significativas con los tratamientos de cisplatino a 40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M por 2 h (Figura 13).

### B) Cisplatino-TSC5

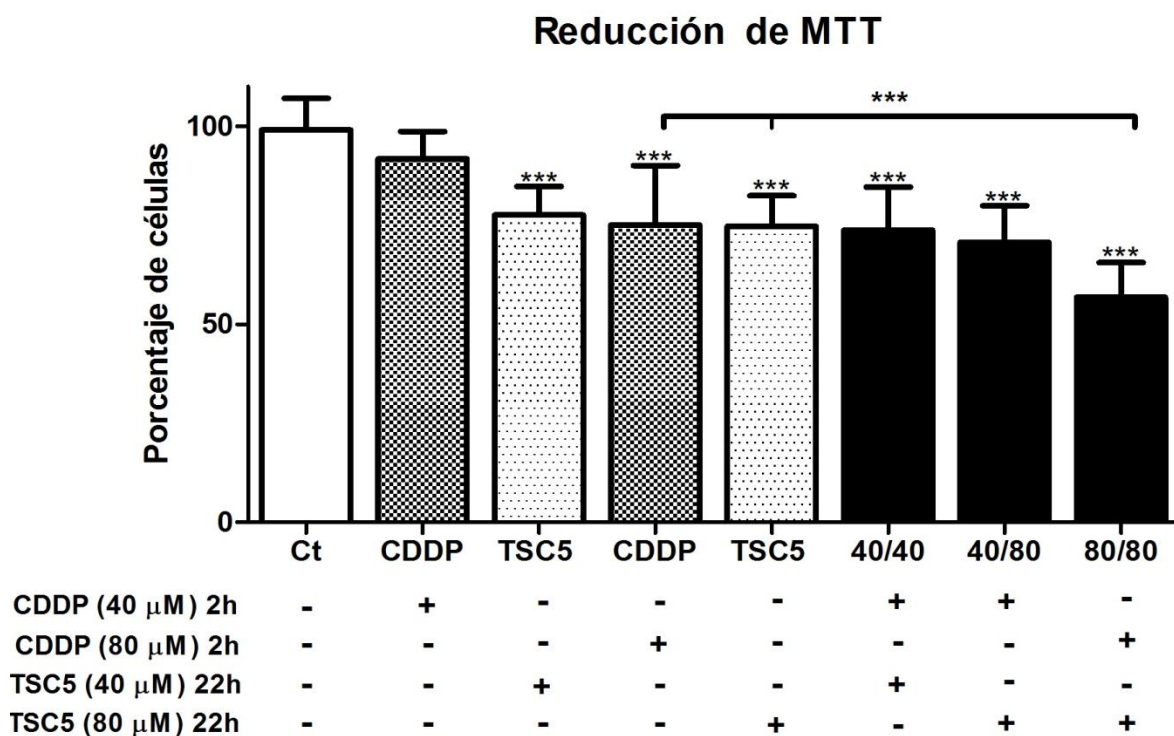
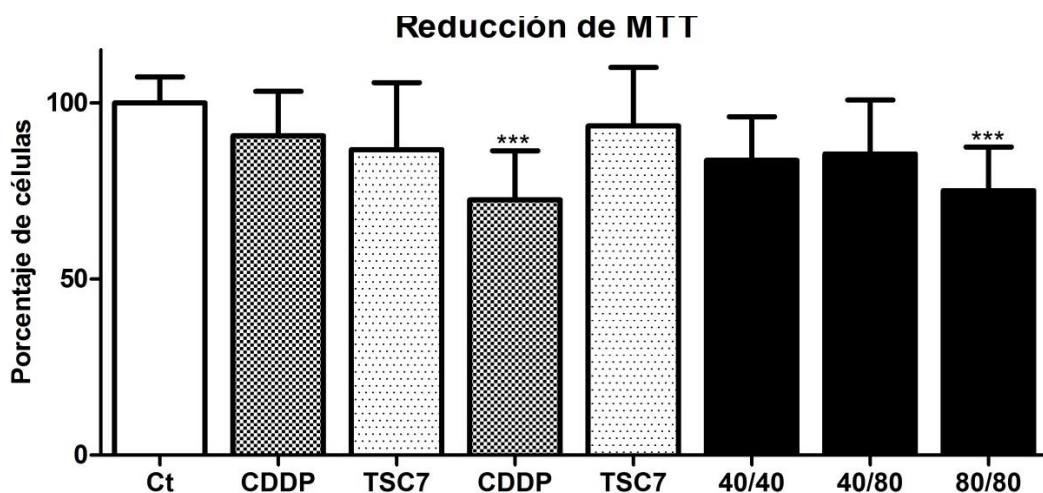


Figura 14. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu$ M, (TSC5 40) TSC5 a 40  $\mu$ M, (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu$ M, (TSC5 80) TSC5 a 80  $\mu$ M, (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas. \*\*\*: P < 0.001.

La incubación con TSC5 por 22h a 40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M, redujo la viabilidad en 22.41% y 25.25%, respectivamente. El tratamiento con CDDP por 2 h a 40  $\mu$ M no mostró inhibición, y a 80  $\mu$ M alcanzó 24.92%. En los tratamientos combinados se observó los efectos inhibitorios: 40/40, 26.22%; 40/80, 29.31%; y 80/80, 43.19%. Estos resultados muestran un efecto aditivo en la inhibición de la viabilidad en la combinación 80/80 (Figura 14).

### C) Cisplatino- TSC7



CDDP (40 $\mu$ M) 2h	-	+	-	-	-	+	+	-
CDDP (80 $\mu$ M) 2h	-	-	-	+	-	-	-	+
TSC7 (40 $\mu$ M) 22h	-	-	+	-	-	+	-	-
TSC7 (80 $\mu$ M) 22h	-	-	-	-	+	-	+	+

Figura 15. Reducción de MTT en células de cáncer de mama MCF7, (Ct) sin tratamiento; (CDDP 40) cisplatino a 40  $\mu$ M, (TSC5 40) TSC7 a 40  $\mu$ M, (CDDP 80) cisplatino a 80  $\mu$ M, (TSC7 80) TSC7 a 80  $\mu$ M, (40/40) tratamiento A, (80/80) tratamiento B y (80/80) tratamiento C a 24 horas. \*\*\*: P <0.001.

En los ensayos con TSC7 únicamente se observaron efectos significativos con el cisplatino sin combinar a 80  $\mu$ M (27.58%) y en el tratamiento en combinación 80/80 (24.96%). No hubo efecto aditivo en la combinación con ambos agentes químicos (Figura 15).

## 7.-DISCUSIÓN

Actualmente la problemática del cáncer abarca un total de 8.2 millones de muertes según lo reportado en 2012 por la Organización Mundial de la Salud, por lo que esta enfermedad es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, encontrando que los cánceres con mayor incidencia y mortalidad son los de pulmón, próstata y el cáncer de mama (OMS, 2012; GLOBOCAN, 2012). En nuestro país, el cáncer es la tercera causa de muerte (OMS, 2012) y cada año se detectan 128 mil casos nuevos, siendo los de mayor índice de mortalidad los de próstata, mama y cérvix en nuestra población (GLOBOCAN, 2012; SSA y SPPS, 2013). La atención médica que requieren estos pacientes representa un alto gasto económico en todos los sistemas de salud del mundo.

La detección del cáncer en etapas tardías, así como los efectos secundarios de los fármacos empleados en la terapia contra el cáncer complican la efectividad del tratamiento. Un ejemplo específico en el cáncer de mama, es el empleo del cisplatino, un fármaco altamente efectivo pero cuya principal desventaja es la nefro- y ototoxicidad, lo que conduce a suspender este tratamiento y sustituirlo por uno distinto que frecuentemente es menos efectivo (Chirino y Pedraza, 2009; Daugaard y Abildgaard, 1989).

Debido a lo anterior, actualmente existen diferentes estrategias de salud pública para tratar de a) prevenir el desarrollo de cáncer asociado a factores ambientales, b) detectar el cáncer en etapas tempranas (National Health Service (NHS), 2016), c) desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento y d) disminuir los efectos tóxicos de fármacos que son eficientes mediante su uso en combinación con nuevos fármacos de baja toxicidad a concentraciones menores (Lu, *et al*, 2015).

En esta tesis se planteó como objetivo encontrar nuevos compuestos con actividad en la disminución de la viabilidad celular en modelos *in vitro* de cáncer de mama y combinarlos con una concentración baja de cisplatino, para aumentar el efecto inhibitorio de ambos compuestos. Con esta estrategia se podrían reducir las concentraciones o dosis necesarias, aumentando la eficacia terapéutica y reduciendo la toxicidad.

En cuanto a la primera estrategia en salud pública, es decir, la prevención, se basa en evitar los factores de riesgo que promueven el cáncer. Por ejemplo, se sabe que el cáncer de colon tiene como factores de riesgo, el sedentarismo y la alimentación; el cáncer de piel está asociado a la exposición a rayos ultravioleta y el cáncer de pulmón está fuertemente asociado al tabaquismo. La estrategia entonces de prevención para estos 3 tipos de cáncer es promover el ejercicio y la alimentación adecuada, evitar la exposición a rayos UV, así como la difusión de campañas antitabaquismo, respectivamente.

Sin embargo en ciertos tipos de cáncer, como el de mama, no es posible hacer campañas de prevención cuando el origen debe a mutaciones. Entonces la siguiente estrategia es diagnóstico temprano. Dicha estrategia implica el desarrollo de nuevas metodologías experimentales altamente sofisticadas resultando no solamente de costo elevado sino que requieren de inversión de tiempo en el desarrollo. La producción de nuevos fármacos es una estrategia que se ha mantenido de forma ininterrumpida en las últimas décadas, pero resulta también costosa en términos económicos y de tiempo.

La cuarta estrategia que consiste en combinar fármacos, es la que se llevó a cabo en esta tesis. Esta estrategia consistió en usar un tratamiento combinado usando concentraciones más bajas de un fármaco altamente efectivo y de bajo costo con un compuesto nuevo de alta actividad biológica para potenciar el efecto del cisplatino. Esto tendría como efecto la disminución de los efectos secundarios, ya que el cisplatino induce efectos tóxicos en el paciente haciendo que aproximadamente 30% de los pacientes suspendan el tratamiento (Chirino y Pedraza, 2009). A pesar de ello, el cisplatino sigue siendo un tratamiento altamente utilizado para la quimioterapia lo que nos lleva a proponerlo como un buen candidato para combinar con nuevos compuestos para mejorar su efecto y disminuir la toxicidad, al reducir su dosis.

Los compuestos elegidos para combinar con el cisplatino fueron las tiosemicarbazonas, de las cuales se probaron siete compuestos derivados de estas moléculas, que fueron sintetizados por colaboradores de este trabajo. Otros derivados de las tiosemicarbazonas han mostrado una gran actividad biológica,

destacando la actividad antineoplásica de la triapina. En uno de sus primeros estudios, la triapina demostró una inhibición en la en la línea celular L1210 de leucemia (Brockman *et al*, 1956). Después de determinaciones experimentales en modelos preclínicos, la triapina llegó a la fase clínica I, siendo probada en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, en otros tumores sólidos avanzados, en leucemia mieloide, entre otros (Shao *et al*, 2006., Finch *et al*; 1999 y 2000 y Wadler *et al*, 2004). En estudios clínicos de fase II se utilizó contra el carcinoma metastásico renal, el carcinoma de cabeza y cuello recurrente, el carcinoma pancreático y el cáncer de pulmón de células no pequeñas, siendo probada en los estudios clínicos de manera individual y en combinación con otro agente quimioterapéutico como cisplatino, gemcitabina, doxorubicina y citarabina. Sin embargo, la triapina presentó efectos secundarios importantes en los pacientes y se suspendiendo su empleo para el tratamiento (Miah *et al*, 2009).

En esta tesis, se probaron 7 compuestos derivados de las tiosemicarbazonas en dos modelos de cáncer de mama; en la línea celular MDA-MB-231, la cual presenta un fenotipo triple negativo (CMTN), es decir, que no expresa los receptores de Progesterona (PR), estrógenos (ER) y el Receptor 2 del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (HER2). La línea celular MCF7 presenta fenotipo positivo para la expresión de ER, variable para PR (+/-) y negativo para HER2 (Holliday y Speirs, 2011).

Los modelos *in vitro* usados en esta tesis tienen en común que son células epiteliales de glándula mamaria aisladas de efusión pleural, siendo este su sitio metastásico (ATCC, 2016), sin embargo presentan mutaciones en genes diferentes, relevantes para los procesos moleculares patológicos del cáncer. Así, MDA-MB231 presenta múltiples mutaciones consideradas patogénicas. Estas mutaciones incluyen al gen ***BRAF* (p.G464V)**, cuyo producto participa en la regulación de la vía de señalización de las MAP cinasas, afectando la división celular, la diferenciación y la excreción llevando a un crecimiento celular descontrolado. Las mutaciones de este gen se presentan principalmente en el cáncer colorrectal, linfoma, carcinoma de pulmón y melanoma (NIH-TCGA, 2015). Otro gen mutado en esta línea es ***CDKN2A***, el cual actúa en la inhibición de la

cinasa CDK4 y en la estabilización de la proteína supresora de tumor p53, por lo que participa en la regulación del ciclo celular, en el control de la fase G1. **CDKN2A** frecuentemente presenta mutaciones en el cáncer pancreático y de esófago. Otra alteración presente en la línea celular MD-MB-231 ocurre en **KRAS (p.G13D)**, gen que codifica para una proteína que es miembro de la superfamilia de las GTPasas, activando una variedad en la vía del receptor tirosina cinasa, alterando la señalización, la cuál aumenta la proliferación celular. Las mutaciones en este gen son frecuentes en el cáncer de pulmón, el de páncreas y en el cáncer colorrectal (NIH-TCGA, 2015).

**NF2 (p.E231\*)**, codifica proteínas que se piensa que unen componentes del citoesqueleto con proteínas en la membrana celular como de superficie, transportadoras de iones entre otras, las mutaciones se presentan en cáncer de piel (NCBI Gene, 2016).

**TP53 (p.R280K)**, codifica una proteína supresora de tumor con actividad de factor de transcripción, que en respuesta a distintos tipos de estrés celular regula expresión de genes que inducen arresto celular, apoptosis, senescencia y reparación del DNA (NCBI-Gene, 2016). La mutación de este gen está presente en una gran variedad de cánceres y es la principal alteración genética en el CMTN (ATCC, 2016; COSMIC, 2016, NCBI Gene, 2016 Y NIH-TCGA, 2015).

Por otro lado, la otra línea celular que se empleó en este trabajo, MCF7, tiene mutaciones descritas en **BCR (p.I456T)**, una GTPasa-activadora con actividad de treonina/serina cinasa, cuya fusión al gen ABL es una alteración de relevancia clínica presente en leucemia mielógena. Otro cambio molecular en esta línea es **p.C368Y en FLT3**, un receptor tirosina-cinasa de clase III que regula la hematopoyesis. Las mutaciones en **FLT3** se han descrito en leucemia mieloide aguda y en la leucemia linfoblástica aguda. Otra alteración genética en esta línea celular ocurre en **PAX5 (p.D227H)**, un miembro de los factores de transcripción relevantes durante el desarrollo temprano; y se considera que alteraciones en este gen contribuyen a transformaciones neoplásicas en linfomas (NIH-GHR, 2016). La última alteración de relevancia descrita en MCF7 es la mutación **p.E545K en PIK3CA**, que codifica para la subunidad catalítica de PI3K, una proteína

involucrada en procesos de proliferación, supervivencia, crecimiento y metabolismo (TCGA, 2014). Las alteraciones en PIK3CA son las más frecuentes en el cáncer de mama y tiene una gran importancia oncogénica (ATCC, 2016; COSMIC, 2016, NCBI Gene, 2016) entre otros.

Una explicación probable para las diferencias en la sensibilidad a las TSC en ambos modelos celulares es la posible dependencia de alteraciones genéticas específicas para la actividad inhibitoria de estos compuestos. Debido a que estos compuestos nunca han sido probados, desconocemos sus blancos moleculares y sus mecanismos de acción. Los compuestos con actividad significativa en la viabilidad celular encontrados en esta tesis, las TSC1, 5 y 7, podrían ser probados para definir sus efectos en otros fenotipos malignos como la migración e invasión celular, la pérdida de la apoptosis, la formación de colonias o pérdida de la inhibición por contacto, por mencionar algunos ejemplos. En ese sentido, algunos fármacos antineoplásicos efectivos actúan a otros niveles, diferentes a la proliferación tumoral. Un ejemplo es el anticuerpo monoclonal bevacizumab, un inhibidor de VEGFR que antagoniza la formación de microvasculatura en el proceso angiogénico de los tumores sólidos (Shih, 2006). Por lo tanto, ya que ha demostrado atrasar el crecimiento en tumores llegando a largar la vida de los pacientes (NIH-INC, 2011)

Gracias a estos ensayos realizados puede ser un indicio de en qué modelos se pudieran utilizar y en que procesos están involucrados estos compuestos como por ejemplo se podría pensar que en líneas celulares con mutaciones presentes en MCF7, estos compuestos derivados de las tiosemicarbazonas (TSC1, 5 y 7) tendrían algún efecto en la disminución de la viabilidad celular.

Las ventajas de la estrategia empelada en esta tesis, en la que se disminuye la concentración de un agente antineoplásico como el cisplatino, es que se utilizaron concentraciones más bajas que la  $CI_{50}$  y que al combinarse se observa que se potenció el efecto observado con la TSC5 con la combinación cisplatino-TSC5 (80  $\mu$ M) que mostró diferencias significativas. Es posible que las TSC1 y TSC7 no mostraran efectos en los ensayos de combinación debido al corto tiempo de incubación con el cisplatino, el cual fue de 2 h. Un reporte reciente, mostró efectos



con la tiosemicarbazona triapina en combinación con cisplatino, empleando 6 horas de incubación previa con triapina, por lo que es posible que el tiempo de exposición previo a la incubación con el segundo agente químico tenga un efecto muy importante en la inhibición de la viabilidad (Ratner, 2016).

Los compuestos con actividad significativa en la viabilidad celular encontrados en esta tesis, las TSC1, TSC5 y TSC7, podrían ser probados para definir sus efectos en otros fenotipos malignos como la migración e invasión celular, la pérdida de la apoptosis, la formación de colonias o pérdida de la inhibición por contacto, por mencionar algunos ejemplos. En ese sentido, algunos fármacos antineoplásicos efectivos actúan a otros niveles, diferentes a la proliferación tumoral. Un ejemplo es el bevacizumab, un inhibidor de VEGFR, aprobado por la FDA, que antagoniza la formación de microvasculatura en el proceso angiogénico de los tumores sólidos (Shih, 2006). Por lo tanto, futuros esfuerzos en la caracterización de las TSC estudiadas en este trabajo podrían concentrarse en la caracterización de estos fenotipos, empleando diferentes modelos de líneas celulares.

Por otro lado, otra estrategia experimental de caracterización de estos compuestos que podría desarrollarse es el empleo de modelos *in vivo*, que representen tumores con distintas alteraciones moleculares y que podrían revelar distintos efectos inhibitorios o efectos más marcados, los cuales sean dependientes de alteraciones moleculares específicas relevantes en distintos tipos de cáncer. El interés en la caracterización de los derivados de TSC es muy alto, debido a su potencial como agentes antitumorales, y se manifiesta en los 33 estudios clínicos que actualmente se están llevando a cabo en Estados Unidos (Clinical trials, 2016). Trabajos como este, con moléculas innovadoras, son el inicio de todo desarrollo farmacéutico y tienen relevancia en el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antitumoral.

## 8.- CONCLUSIONES

La línea celular MDA-MB-231 no mostró sensibilidad con los 7 compuestos derivados de las tiosemicarbazonas al contrario de la línea celular MCF7.

La TSC1 a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  a 48 horas presentó el porcentaje mayor de inhibición de 80.10% de los siete compuestos evaluados, mientras que cisplatino a la misma concentración y tiempo evaluado fue de 81.76%.

La  $\text{CI}_{50}$  más baja en la línea celular MCF7 fue de 67.44  $\mu\text{M}$  con la TSC1 a 48 horas mientras que la del cisplatino evaluada a las mismas condiciones fue de 57.59  $\mu\text{M}$ .

La combinación (cisplatino-TSC5) 80  $\mu\text{M}$  a 24 horas obtuvo un porcentaje de inhibición de 43.19 % que cisplatino (CDDP 80  $\mu\text{M}$ ) de 24.92% y TSC5 80  $\mu\text{M}$  de 25.25%.

## ANEXO

### Síntesis de las tiosemicarbazonas

Se colocó en un matraz el NaH previamente pesado, enseguida se lavó con metilciclohexano. El sólido obtenido se secó al vacío y se colocó bajo atmósfera de Nitrógeno. Se adicionó 10 cc de THF recién destilado y seco, se incorporó el tiol respectivo y se dejó agitando a temperatura ambiente durante el tiempo requerido para llevar a cabo la reacción. Posteriormente, se pesó el aldehído utilizado (diferente para cada tiosemicarbazona), a la disolución obtenida se le agregó lentamente la disolución del tiol previamente filtrada, la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente, se observó la aparición de un precipitado. Posteriormente, la disolución se filtra y se lleva a sequedad. El producto obtenido es un sólido cristalino (aldehído intermediario).

Se disolvió el aldehído en etanol y se disolvió la tiosemicarbazida en una mezcla etanol-agua, por separado. Una vez disueltos ambos compuestos se adicionó la tiosemicarbazida al aldehído en medio ácido, la mezcla obtenida se llevó a reflujo y se dejó agitando hasta completar la reacción, la mezcla se filtró y la disolución es separada al vacío, se observó la aparición de un precipitado el cuál se filtró. Este precipitado se purificó mediante recristalización. El compuesto obtenido es la tiosemicarbazona derivada correspondiente, al aldehído empleado.

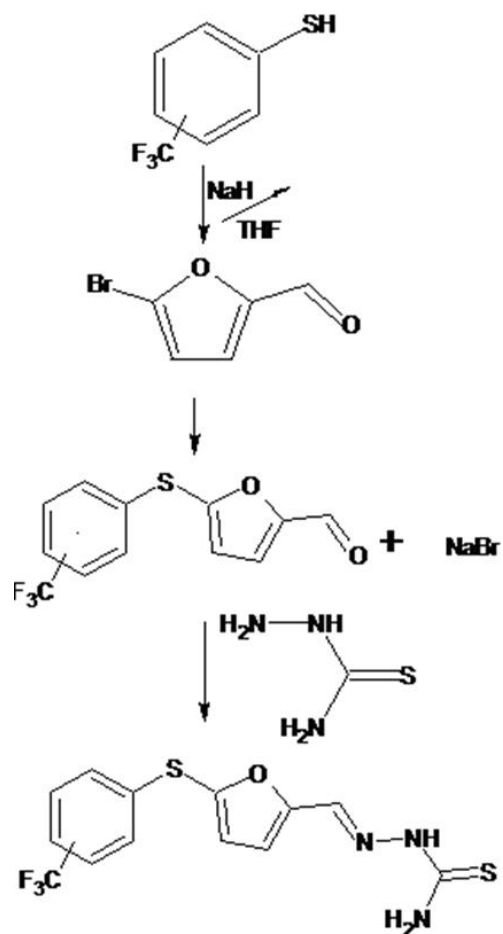


Figura X. Ruta de síntesis para obtención de las Tiosemicarbazonas correspondientes.

## 9.- PERSPECTIVAS

Evaluar a TSC5 en otros procesos del cáncer como migración, invasión, apoptosis entre otros para conocer si están involucradas en otros procesos importantes y tener una caracterización de este compuesto más completa.

Evaluar en otros modelos *in vitro* ya sea en otros tipos de cáncer o en líneas celular con las mutaciones de la línea MCF7, para conocer si son sensibles ante este compuestos y comparar la disminución en la viabilidad con una línea celular no cancerígena para encontrar algún posible mecanismo de acción.

Evaluar en un modelo *in vivo* por ejemplo de xenotransplante con células MCF7, para observar el comportamiento del modelo y conocer cómo va afectando en su peso por ejemplo y medir si hay disminución en el tumor al estar expuesto a este compuesto

## 10.-BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto H., Fernández, M., González, M., Denicola, A., Otero, L; *et al.* 2004. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing Thiosemicarbazones. *Bioorg Med Chem.* Vol 12: 4885-4893.
- American Cancer Society (ACS). 2014. Find Support & Treatment. <http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/guidetocancerdrugs/cisplatin>.
- American Cancer Society (ACS). 2014. Cancer facts and figures 2014. Pp.1-68.
- American Society of Clinical Oncology (ASCO). 2014. Understanding Chemoteraphy. [http://www.cancer.net/sites/cancer.net/files/asco\\_answers\\_chemotherapy.pdf](http://www.cancer.net/sites/cancer.net/files/asco_answers_chemotherapy.pdf).
- Antholine, W., Knight, J., Petering, D. 1976. Inhibition of tumor cell transplantability by iron and copper complexes of 5-substituted 2-formylpyridine Thiosemicarbazones. *Med. Chem.* Vol 19: 339.
- Bharti, N., Athar, F., Maurya, M. Synthesis, characterization and *in vitro* anti-amoebic activity of new paladium (II) complexes with 5-nitrothipene-2-carboxaldehyde N(4)-substituted Thiosemicarbazones. 2004. *Bioorg. J. Med Chem.* Vol 12: 4679.
- Beraldo, H. 2004. Semicarbazones and thiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications. *Quim Nova.* Vol 27: 461-469.
- Beraldo, H., Gambino, D. 2004. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, Thiosemicarbazones and their metal complexes. *Mini Rev Med Chem.* Vol 4: 31-39.
- Brockman, R., Thomson, J., Bell, M., Skipper H. 1956. Observations on the Antileukemic Activity of Pyridine-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazone and Thiocarbohydrazone. *Cancer Res.* Vol.16: 167-170.

- Domagk, G., Behnisch, R. 1946. New compound active against Tuberculosis bacilli *in vitro*, *Naturwissenschaften*, Vol. 33: 315.
- Campbell, M. 1975. Transition metal complexes of thiosemicarbazide and Thiosemicarbazones. *Coord. Chem Rev.* Vol 15: 279-319.
- Chirino, Y., Pedraza-Chaverri, J. 2009, Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity, *Exp Toxicol Pathol*, Vol. 61(3): 223-224.
- Clinical trials. 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=triapine>
- Collins, F., Klayman, D., Morrison N. 1982. Activity of 2-acetylpyridine and 2-acetylquinoline thiosemicarbazones tested *in vitro* in combination with other antituberculous drugs. *Am Rev Respir Dis.* Vol. 125: 58-60.
- Daugaard, G., Abildgaard, U. 1989. Cisplatin nephrotoxicity a review. *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol. 25: 1–9.
- Fujii, N., Mallari, J., Hansell, E., Mackey, Z., Doyle, P., Zhou, Y., Gut, J., *et al.* 2005. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* Vol.15: 121–123.
- Finch, R., Liu, M., Cory, A., Cory, J., Sartorelli, A. 1999. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP): an inhibitor of ribonucleotide reductase with antineoplastic activity. *Adv Enzyme Regul.* Vol. 39: 3-12.
- Finch, R., Liu, M., Grill, S., Rose, W., Loomis, R., Vasquez, K., Cheng, Y., Sartorelli, A. 2000. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochem Pharmacol.* Vol.59: 983-991.
- French, F., Blanz, E., Do Amaral, J., French, D. 1970. Carnostatic activity of thiosemicarbazones of formyl heteroaromatic compounds. VII. 2-Formylpyridine derivatives bearing additional ring substituents. *J Med Chem.* Vol. 13(6): 1124-1130.
- García, A., Cao, R., Canales, C. 1989. Sobre los compuestos de coordinación como agentes antitumorales. IV. Acción sobre el radical superóxido. *Rev. Cubana.* Vol. 23(1-2): 29-33.

- GLOBOCAN. 2012. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.  
[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
- GLOBOCAN. 2012. Estimated Cancer incidence, Mortality and prevalence México in 2012. [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx).
- Greenbaum, D., Mackey, Z., Hansell, E, Doyle, P., Conor, R, *et al.* 2004. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasitocidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi. J. Med Chem. Vol. 47: 3212-3219.
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. Vol. 100: 57–70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. 2011. The hallmarks of cáncer: The next generation. Cell. Vol. 144: 646–674.
- Hu, X., Zhou, X., Xia, C., Wen, X. 2006. Synthesis and anticancer activity of Thiosemicarbazones. Bioorg Med Chem Lett. Vol.16: 2213-2218.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2014, World Cancer Report 2014. [www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/wcr-order.php](http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/wcr-order.php).
- Instituto Nacional del Cáncer, 2015, Tratamiento del Cáncer.  
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/efectos-secundarios>
- Jursic, B., Neumann, D. 2001. Preparation of 5-formyl and 5-acetylbarbituric acids, including the corresponding Schiff bases and phenylhydrazones. Tetrahedron Lett. Vol.42: 8435–8439.
- Kalinowski, D., Quach, P., Richardson, D. 2009. Thiosemicarbazones: the new wave in cáncer treatment. Future Med Chem. Vol. 1: 1143-1151.
- Katzung, B. 2003. Farmacología Básica y Clínica. Editorial: Manual Moderno, México, 10ª edición, Cap. 13, Pp. 1011-1049.
- Kelland, L., Barnard, C., Mellish, K., Jones, M., Goddard, P., *et al.* 1994. A Novel trans-Platinum Coordination Complex Possessing in Vitro and in Vivo Antitumor Activity. Cancer Research. Vol. 54: 5618-5622.
- Klayman, D., Bartosevich, J., Griffiin, T., Mason, C., Scovill, J.1979. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones. 1. A new class of potential antimalarial agents. J Med Chem. Vol. 22: 855-862.



- Kovala-Demertzi, D., Domopoulou, A., Demertzis, M., Valle, G., Papageorgiou, A. 1997. Palladium (II) complexes of 2-acetylpyridine N (4)-methyl, N (4)-ethyl and N (4)-phenyl-thiosemicarbazones. Crystal structure of chloro (2-acetylpyridine N (4)-methylthiosemicarbazonato) palladium (II). Synthesis, spectral studies, *in vitro* and *in vivo* antitumour activity. J Inorg Biochem. Vol 68(2): 147-155.
- Kovala-Demertzi, D., Boccarelli, A., Demertzis, M., Coluccia, M. 2007. In vitro antitumor activity of 2-acetyl pyridine 4n-ethyl thiosemicarbazone and its platinum(II) and palladium(II) complexes. Chemotherapy. Vol. 53(2): 148-152.
- Kratz, F., Nuber, B., Weiß J., Keppler K. 1991. Synthesis and characterization of potential antitumor and antiviral gallium(III) complexes of  $\alpha$ -(N)-heterocyclic Thiosemicarbazones. Synth React Inorg Met-Org Chem. Vol. 21: 1601-1615.
- Kuetea, V., Saeeda, M., Kadioglua, O., Börtzler, J., Khalid, H., Greten, H., Efferth, T. 2015. Pharmacogenomic and molecular docking studies on the cytotoxicity of the natural steroid wortmannin against multidrug-resistant tumor cells, Phytomedicine. Vol. 22: 120–127.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N. 2005. Robins & Cotran, Patología estructural y funcional. Editorial: El sevier. 7<sup>a</sup> edición. España. Pp.273.
- Lebwohl, D., Canetta, R. 1998, Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. Eur J Cancer. Vol. 34: 1522-1534.
- Liu, M., Lin, T., Sartorelli, A. 1992. Synthesis and antitumor activity of aminoderivatives of pyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone. J Med Chem. Vol 35(20): 3672-3677.
- Liu, M., Lin, T., Penketh, P., Sartorelli, A. 1995. Synthesis and antitumor activity of 4- and 5-substituted derivatives of isoquinoline-1-carboxaldehyde thiosemicarbazone. J. Med. Chem. Vol. 38(21): 4234-4243.
- Lu, D; Chen, E, Ding, J; Xu, B; Lu, T. 2015. Anticancer Drug Combinations, A Big Momentum is Needed. Metabolomics. Vol 5(3) 1-4.

- Mc Murry, J. 2012. Química Orgánica, Edit. Cengage Learning, 8ª edición. Pp.736-740.
- Miller, M., Bastow, K., Stineman, C., Vance, J., Song, S., West, D., Hall I. 1998. The cytotoxicity of 2-formyl and 2-acetyl-(6-picoyl)-4N-substituted thiosemicarbazones and their copper (II) complexes. Arch. Pharm. Vol 331(4): 121.
- Miller, M., Stineman, C., Vance, J., West, D., Hall, I. 1998. The cytotoxicity of copper (II) complexes of 2-acetyl-pyridyl-4N-substituted Thiosemicarbazones. Anticancer Res. Vol. 18(6A): 4131.
- National Health Service (NHS), 2016. Achieving World-Class Cancer Outcomes: Taking the strategy forward. Acceso: Julio 2016.  
<https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2016/05/cancer-strategy.pdf>
- National Institute of Health (NIH); Instituto Nacional del Cáncer (INC). 2011.  
<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/inmunoterapia/hoja-informativa-inhibidores-angiogenesis>
- National Institute of Health (NIH); Instituto Nacional del Cáncer (INC). 2014.  
<http://www.cancer.gov/espanol>.
- National Institute of Health (NIH); The Cancer Genome Atlas (TCGA). 2016.  
<http://cancergenome.nih.gov/>.
- National Institute of Health (NIH); Genetics Home Reference (GHR). 2016.  
<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NF2>.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Nota descriptiva N° 297.  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
- Pfau, C. 1982. The Thiosemicarbazones. Handb Exp Pharmacol. Vol. 61: 147
- Perry, M. C.1992. The chemotherapy sourcebook. 1ª edición. Edit: Williams & Wilkins. USA. Pp. 2-64.
- Quiroga, A., Pérez, J., López-Solera, I., Masaguer, J., Luque, A., Roman, P., *et al.* 1998. Novel tetranuclear orthometalated complexes of Pd (II) and Pt (II) derived from p-isopropylbenzaldehyde thiosemicarbazone with cytotoxic activity in cis-DDP resistant tumor cell lines. Interaction of these complexes with DNA. J. Med Chem. Vol. 41(9): 1399-1408.

- Ratner, E; Zhu, Y; Penketh, P; Berenblum, J; Whicker, M; Huang, P *et al.* 2016. Triapine potentiates platinum-based combination therapy by disruption of homologous recombination repair. *B J cáncer*. Vol 114: 777-786.
- Rodríguez-Argüelles, M., Ferrari, M., Fava, G., Pelizzi, C., Pelosi, G., Albertini, R., Bonati, A., Dall'Aglio, P., Lunghi, P., Pinelli S. 1997, Acenaphthenequinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes: synthesis, structure, and biological activity. *J. Inorg. Biochem.* Vol. 66(1): 7.
- Saryan, L., Mailer, K., Krishnamurti, C., Anthoine, W., Petering, D. 1981. Interaction of 2-formylpyridine thiosemicarbazone copper (II) with ehrlich ascites tumor cells. *Biochem Pharma.* Vol 30: 1595-1604.
- Secretaría de Salud (SSA), Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS), 2013, Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos. <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>.
- Shailendra, N., Naqvi, F., Azam, A. 2003. Synthesis, Spectral Studies and Screening for Amoebicidal Activity of New Palladium (II) Complexes Derived from Thiophene-2-carboxaldehyde Thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Vol.13: 689–692.
- Shao, J., Zhou, B.; Di Bilio, A., Zhu, L.; Wang, T.; Qi, C.; Shih, J.; Yen, Y. 2006. A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. *Mol Cancer Ther.* Vol. 5(3): 586-592.
- Shao, J., Zhou, B., Bernard, Chu., Yen, Y. 2006. Ribonucleotide Reductase Inhibitors and Future Drug Design. *Current Cancer Drug Targets*. Vol. 6: 409-431.
- Sharma, S., Athar, F., Maurya, M., Naqvi, F., Azam, A. 2005. Novel bidentate complexes of Cu (II) derived from 5-nitrofur-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones with antiamebic activity against *E. histolytica*. *J. Med Chem.* Vol. 40: 557-562.
- Shih, T; Lindley C. 2006. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clinical Therapeutics*. Vol. 28 (11): 1779–1802.

- Sigmond, J., Kamphuis, J., Laan, A., Hoebe, E., Bergman, A., Peters, G. 2007. The synergistic interaction of gemcitabine and cytosine arabinoside with the ribonucleotide reductase inhibitor triapine is schedule dependent. *Biochem Pharmacology*. Vol. 73: 1548-1557.
- Sosa-Durán, E., García-Rodríguez, F. 2013. Panorama epidemiológico del cáncer en México. *Revista Mexicana de Anestesiología*. Vol. 36: 130-132.
- Thimmaiah, K., Chandrappa, G., Lloyd, W. 1985. Synthesis and chemical characterization of biologically important complexes of vanillin thiosemicarbazone with manganese(II), iron(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II), zinc(II), cadmium(II), and mercury(II). *Transition Met Chem*. Vol. 10: 299-302.
- Union for International Cancer Control (UICC). 2014. World Cancer Day 2014. <http://www.worldcancerday.org/>.
- Van Moorsel, C., Smid, K., Voorn, D., Bergman, A., Pinedo, H., Peters, G. 2003. Effect of gemcitabine and cis-platinum combinations on ribonucleotide and deoxyribonucleotide pools in ovarian cancer cell lines. *Int J Oncol*. Vol.22: 201-207.
- Wadler, S., Makower, D., Clairmont, C., Lambert, P., Fehn, K., Sznol, M. 2004. Phase I and pharmacokinetic study of the ribonucleotide reductase inhibitor, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone, administered by 96-hour intravenous continuous infusion. *J. Clin. Oncol*. Vol. 22: 1553-1563.
- Waalkes, P; Sander, K; Smith, G; Adamson, R. 1974. DNA Polymerases of Walker 256 carcinosarcoma. *Cancer Res*. Vol. 34: 385-391.
- West, D., Liberta, A., Rajendran, K., Hall, I. 1993. The cytotoxicity of copper (II) complexes of heterocyclic thiosemicarbazones and 2-substituted pyridine N-oxides. *Anticancer Drugs*. Vol 4: 241-249.
- West, D., Padhye, S., Sonawane, P. 1991. Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbamate complexes. *Structure Bonding*. Vol. 76: 1-50.
- Yalowich, J., Wu, X., Zhang, R., Kanagasabai, R., Hornbaker, M., Hasinoff, B. 2012. The anticancer thiosemicarbazones Dp44mT and triapine lack

inhibitory effects as catalytic inhibitors or poisons of DNA topoisomerase II $\alpha$ .  
Biochem Pharmacol. Vol.84: 52-58.