

Evaluación de la actividad anticancerígena *in vitro* de nuevos híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol y tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre células de adenocarcinoma de hígado, pulmón, cervix, mama y melanoma

Brayan Ferney Estiwar Valderrama Solano

Trabajo de grado para optar el título de Químico

Directora

Stelia Carolina Méndez Sánchez

Doctora en Bioquímica

Codirector

Luis Carlos Vesga Gamboa

Químico

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2018

A mi madre Carmen Inés por su apoyo y amor incondicional

Agradecimientos

En primer lugar, agradecerle a Dios por todas las bendiciones y por darme una excelente madre, que me ha guiado y apoyado en el camino de la vida. Gracias a ella por siempre querer darme lo mejor e inculcarme la humildad, por ser mi consejera y formarme para ser una gran persona.

A mi padre Wilson y a mi hermano Hernán Darío por el apoyo y las enseñanzas a lo largo de la vida. A mis abuelitas Raquel y María del Carmen de las cuales aprendí a amar el campo e hicieron parte importante en mi formación y la mentalidad que tengo hoy en día. A toda mi familia, especialmente a mis tíos por ayudar a forjar mi carácter.

Inmensos agradecimientos a la profesora Stelia Méndez por permitirme trabajar bajo su dirección y haberme enseñado tanto. A mi codirector Luis Carlos Vesga por guiarme, apoyarme y brindarme tantos conocimientos a lo largo del desarrollo de este proyecto.

Finalmente, agradecerles a todos los profesores que hicieron parte de mi formación académica y a todos los compañeros del Grupo de Investigación en Bioquímica y microbiología, los cuales me brindaron su ayuda y muchos conocimientos.

Tabla de contenido

Introducción.....	14
1. Marco teórico y estado de arte.....	15
1.1 El cáncer	15
1.2 Genes y proteínas involucrados en el desarrollo del cáncer	15
1.3 Ciclo celular	17
1.4 Muerte celular.....	19
1.4.1 Apoptosis	19
1.4.2 Autofagia	23
1.4.3 Necrosis.....	24
1.5 Tratamiento del cáncer	26
1.6 Triazoles, Tiazolidinas, isoxazoles, Tetrahydroquinolinas e isoxazolininas.....	28
1.6.1 1,2,3-Triazoles y su importancia biológica	28
1.6.2 Tiazolidinas y su importancia biológica.....	31
1.6.3 Isoxazoles y su importancia biológica	33
1.6.4 Tetrahydroquinolinas y su importancia biológica.....	35
1.6.5 Isoxazolininas y su importancia biológica	36
2. Objetivos	39
2.1 Objetivo general.....	39
2.2 Objetivos específicos.....	39
3. Materiales y métodos	40
3.1 Cultivo celular	40
3.2 Determinación de viabilidad celular	41
3.3 Ensayo de proliferación celular.....	41
3.4 Estudio Morfológico.....	42
3.5 Liberación de citocromo c.....	42
3.6 Ensayo de muerte celular utilizando <i>PE ANEXINA V/SYTOX GREEN</i> por Citometría de flujo	43
3.7 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial usando Rodamina-123	43
3.8 Análisis estadístico	44
4. Resultaos y discusión	45
4.1 Efectos de los híbridos sobre la viabilidad y la proliferación celular	45
4.1.1 Efecto de los híbridos en la viabilidad celular	45

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERIGÉNA

7

4.1.2 Efecto del híbrido CB41 sobre la proliferación celular.....	48
4.2 Determinación del mecanismo de muerte celular causado por CB41	51
4.2.1 Efecto del híbrido CB41 sobre la morfología celular	51
4.2.2 Efecto del compuesto CB41 sobre la liberación de citocromo c.....	53
4.2.3 Efecto del compuesto CB41 en la translocación de fosfatidilserina	55
4.2.4 Efecto del híbrido CB41 sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	57
5. Conclusiones	60
6. Recomendaciones	61
7. Divulgacion de Resusltados.....	61
Referencia Bibliográficas.....	62
Apéndices.....	72

Lista de tablas

Tabla 1. Valores de CI_{50} (μM) con MTT para los ensayos a 48 horas de tratamiento.....**47**

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo celular eucariota.....	18
Figura 2. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis.....	21
Figura 3. Estructuras de los complejos cisplatino (A), carboplatino (B), y oxaliplatino (C).....	26
Figura 4. Estructura molecular de la camptotecina.....	27
Figura 5. Anillo de 1,2,3-triazol.....	28
Figura 6. Estructura del compuesto anticancerígeno CAI.....	29
Figura 7. Estructura del catión del complejo [Ru([9]aneS3)Cl(ppt)][CF ₃ SO ₃].....	29
Figura 8. Estructura del compuesto 1-ciclohexil-3(RS)-(4-{2-metoxi-4-[3-(4-metoxifenil)-3-oxo- propenil]fenoximetil}-[1,2,3]triazol-1-il)-4(SR)-estiril-azetidina-2-ona.....	30
Figura 9. Estructura del 2-metoxi-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-5-il) Anilina.....	31
Figura 10. Anillo de tiazolidina.....	31
Figura 11. Estructura molecular del compuesto AL67.....	32
Figura 12. Estructura de los compuestos arilideno-tiazolidina-2,4-dionas N-3-sustituidas.....	33
Figura 13. Anillo de isoxazol.....	33
Figura 14. Estructura del éster 3-(2-cloro-fenil)-isoxazol-5-il-metil del ácido carboxílico de ferroceno.....	34
Figura 15. Estructura del compuesto N-(3-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-4-(4-((4- morfolinopiperidin-1-il)metil)fenil)isoxazol-5-il)ciclopropanocarboxamidas.....	34
Figura 16. Estructura molecular de la tetrahydroquinolina.....	35
Figura 17. Estructura del compuesto (±)-1-(1-(4-Clorobencil)-1,2,3,4-tetrahydro-6- metoxiquinolina-4-il)pirrolidin-2-ona.....	36
Figura 18. Estructura del 4-(4-Fluoro-fenil)-2-fenil-5,6,7,8-tetrahydroquinolina.....	36
Figura 19. Anillo de isoxazolina.....	37
Figura 20. Estructura molecular del compuesto 4-nitrofenil-2-isoxazolin Witaferina A.....	37
Figura 21. Estructura de los compuestos 6c y 6i.....	38
Figura 22. Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 12 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 µM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar del número de células viables. *P<0,05 frente al control.....	49

- Figura 23.** Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 μM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células viables. * $P < 0,05$ frente al control..... **49**
- Figura 24.** Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 48 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 μM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células viables. * $P < 0,05$ frente al control..... **50**
- Figura 25.** Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 72 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 μM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células. * $P < 0,05$ frente al control, ** $P < 0,01$ frente al control y *** $P < 0,001$ frente al control..... **50**
- Figura 26.** Morfología de células HeLa sin tratamiento (control) y con tratamiento (10 μM) a 24 y 48 horas..... **53**
- Figura 27.** Liberación de citocromo c en células Hela tratadas con CB41 y Camptotecina..... **54**
- Figura 28.** Tinción con anexina V-Sytox de células HeLa tratadas con el compuesto CB41 y camptotecina..... **56**
- Figura 29.** Efecto del compuesto CB41 sobre el potencial de membrana mitocondrial..... **58**

Lista de Apéndices

Apéndice A. Estructuras moleculares de los híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol y tetrahydroquinolina/isoxazolina.....	72
Apéndice B. Nombres IUPAC y peso molecular de los híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol y tetrahydroquinolina/isoxazolina.....	73
Apéndice C. Certificado del 1 er Encuentro Internacional en Ciencias de la Salud.....	74
Apéndice D. Certificado del III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2.....	75

Resumen

TITULO:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA *in vitro* DE NUEVOS HÍBRIDOS TIAZOLIDINA/1,2,3-TRIAZOL, TIAZOLIDINA/ISOXAZOLINA Y TERAHIDROQUINOLINA/ISOXAZOLINA, SOBRE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE HÍGADO, PULMÓN, CÉRVIX, MAMA Y MELANOMA*

AUTOR: Brayán Ferney Estiwar Valderrama Solano**

PALABRAS CLAVE: 1,2,3-triazol, tiazolidina, isoxazol, tetrahydroquinolina, isoxazolina, actividad biológica, actividad anticancerígena, HeLa, MCF-7, A549, Hep G2, B16F10, citotoxicidad, Vero, oxaliplatino, control positivo, FM113, concentración inhibitoria 50, índice de selectividad, CB41, proliferación celular, muerte celular, citocromo c, citosol, potencial de membrana mitocondrial.

RESUMEN

Para los anillos de los 1,2,3-triazoles, tiazolidinas, isoxazoles, tetrahydroquinolinas e isoxazolinas se han reportado un gran número de actividades biológicas, y su actividad anticancerígena los postuló para ser objeto de estudio en el presente trabajo. En el cual se evaluó el potencial anticancerígeno de los nuevos híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol y tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las líneas celulares HeLa, MCF-7, A549, Hep G2 y B16F10. Además, se evaluó la citotoxicidad de los compuestos en la línea celular no cancerígena Vero.

Inicialmente se analizó la citotoxicidad de los híbridos en las líneas celulares mencionadas anteriormente, y se usó el oxaliplatino como control positivo. De los compuestos derivados de tiazolidina, el FM113 mostró citotoxicidad en las células B16F10 (concentración inhibitoria 50 (CI₅₀): 40,03±3,82 μM; índice de selectividad (IS): 2,50) y HeLa (CI₅₀: 50,06±0,03 μM; IS: 2), mientras que el híbrido de tetrahydroquinolina/isoxazolina CB41 exhibió citotoxicidad en las células Hep G2 (CI₅₀: 71,70±0,4 μM; IS: 0,58), B16F10 (CI₅₀: 23,33±2,43 μM; IS: 1,79), HeLa (CI₅₀: 10,21±0,92 μM; IS: 4,09) y en la línea no cancerígena Vero (CI₅₀: 41,80±9,96).

De esta manera, el compuesto CB41 presentó el efecto citotóxico más potente en células HeLa, siendo el único que mostró mayor citotoxicidad y selectividad respecto al oxaliplatino. Por lo tanto, se evaluó el efecto de CB41 sobre la proliferación celular en HeLa y se realizaron ensayos para aportar al conocimiento de su mecanismo de acción en la muerte celular. En donde CB41 inhibió la proliferación celular a 72 horas de tratamiento para concentraciones de 2,5-10 μM, generó liberación de citocromo c al citosol y disminuyó el potencial de membrana mitocondrial.

*Trabajo de grado

**Facultad de ciencias. Escuela de química. Directora: PhD Stelia Carolina Méndez Sánchez

Abstract**TITLE:**

EVALUATION OF THE ANTICANCER ACTIVITY *in vitro* OF NEW HYBRIDS THIAZOLIDINE/1,2,3-TRIAZOLE, THIAZOLIDINE/ISOXAZOLE AND TETRAHYDROQUINOLINE/ISOXAZOLINE, ON CELLS OF ADENOCARCINOMA OF LIVER, LUNG, CÉRVIX, MAMA AND MELANOMA*

AUTHOR: Brayan Ferney Estiwar Valderrama Solano**

KEYWORDS: 1,2,3-triazole, thiazolidine, isoxazole, tetrahydroquinoline, isoxazoline, biologic activity, anticancer activity, HeLa, MCF-7, A549, Hep G2, B16F10, cytotoxicity, Vero, oxaliplatin, positive control, FM113, inhibitory concentration 50, selectivity index, CB41, cell proliferation, cell death, cytochrome c, cytosol, mitochondrial membrane potential.

ABSTRACT

For the rings of 1,2,3-triazoles, thiazolidines, isoxazoles, tetrahydroquinolines and isoxazolines a large number of biological activities have been reported, and their anticancer activity postulated them to be the subject of study in the present work. In which was to evaluate the anticancer potential of the new hybrids thiazolidine/1,2,3-triazole, thiazolidine/isoxazole and tetrahydroquinoline/isoxazoline on the HeLa, MCF-7, A549, Hep G2 and B16F10 cell lines. In addition, the cytotoxicity of the compounds in the non-cancer cell line Vero was evaluated.

Initially the cytotoxicity of the hybrids in the cell lines mentioned above was analyzed, and oxaliplatin was used as a positive control. Of the compounds derived from thiazolidine, FM113 showed cytotoxicity in B16F10 cells (inhibitory concentration 50 (IC₅₀): 40,03±3.82 μM, selectivity index (IS): 2,50) and HeLa (IC₅₀: 50,06±0,03 μM; IS: 2), while the hybrid tetrahydroquinoline/isoxazoline CB41 exhibited cytotoxicity in Hep G2 cells (IC₅₀: 71,70±0,4 μM; IS: 0,58), B16F10 (IC₅₀: 23,33±2.43 μM, IS: 1.79), HeLa (IC₅₀: 10.21 ± 0.92 μM, IS: 4.09) and in the non-cancerous Vero line (IC₅₀: 41,80±9.96).

In this way, compound CB41 presented the most potent cytotoxic effect in HeLa cells, being the only one that showed the highest cytotoxicity and selectivity with respect to oxaliplatin. Therefore, the effect of CB41 on cell proliferation in HeLa was evaluated and tests were carried out to contribute to the knowledge of its mechanism of action in cell death. Where CB41 inhibited cell proliferation at 72 hours of treatment for concentrations of 2,5-10 μM, it generated release of cytochrome c to the cytosol and decreased mitochondrial membrane potential.

*Grade work

**Science faculty. Chemistry school. Directora: PhD Stelia Carolina Méndez Sánchez

Introducción

Los compuestos que en su estructura poseen farmacóforos de 1,2,3-Triazol, Tiazolidina, isoxazol, Tetrahydroquinolina e Isoxazolina, han presentado diferentes actividades biológicas, como actividad anticancerígena, antiinflamatoria, anti-VIH, antimalárica, antibacteriana, antifúngica y antitrombótica, entre otras (Dheer, Singh & Shankar, 2017; Havrylyuk, Kovach, Zimenkovsky, Vasylenko & Lesyk, 2011; Ajay Kumar & Jayaroopa, 2013; Sridharan, Suryavanshi & Menéndez, 2011; Prajapati et al., 2015). Cuando dichos farmacóforos se incorporan en una misma molécula para formar híbridos, pueden tener diversas dianas farmacológicas, potenciar su efecto y aumentar la selectividad para disminuir los efectos secundarios adversos (Nepali, Sharma, Sharma, Bedi & Dhar, 2014). Múltiples estudios han reportado efectos citotóxicos prometedores de híbridos derivados de los diferentes farmacóforos estudiados en este trabajo de investigación, y han dilucidado los posibles mecanismos de muerte que generan en las células cancerígenas (Dheer et al., 2017; Romagnoli et al. 2013; Chen D. et al., 2014; Castillo et al., 2018).

De esta manera, con la realización del presente trabajo de investigación, se está haciendo una contribución al conocimiento del potencial anticancerígeno de los híbridos y del mecanismo de acción del compuesto 5-[(6-metil-4-(2'-oxopirrolidin-1'-il)-3,4-dihidroquinolin-1(2H)-il)-metil]-3-(3,4,5-trietoximetoxifenil)-4,5-dihidroisoxazol (CB41) sobre la muerte celular, específicamente su efecto en la morfología celular, liberación de citocromo c, translocación de fosfatidilserina y disminución del potencial de membrana mitocondrial. Los experimentos fueron realizados *in vitro* en las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa), mama (MCF-7), pulmón (A549), hígado (Hep G2) y melanoma murino (B16F10), empleando un microscopio óptico y técnicas de espectrofotometría para detectar marcadores característicos de muerte celular.

1. Marco teórico y estado de arte

1.1 El cáncer

El cáncer se desarrolla debido a un crecimiento celular anormal o patrones alterados de muerte celular, causados por mutaciones en diferentes genes que participan en la regulación del ciclo celular, en la supresión de tumores o en la síntesis y reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico). Todos estos genes afectados sintetizan productos alterados, y la interacción de estos productos con mecanismos de señalización normales del organismo daña la correcta señalización y genera el estado neoplásico (Purvis, Shih, Liu & Radhakrishnan, 2011).

Los factores que generan estas neoplasias son la exposición al sol, el tabaquismo, la dieta, las infecciones, el estrés, la obesidad, la inactividad física, y los contaminantes ambientales (Anand et al., 2008). Otro factor importante es la constitución genética, ya que algunas mutaciones se heredan y ello explica que unas personas sean más susceptibles que otras a desarrollar un tumor (Sullcahuamán-Allende y Arias-Velásquez, 2008). Todos estos factores pueden causar mutaciones en genes y proteínas, promoviendo la división celular descontrolada que caracteriza los tumores (Williams & Stoeber, 2012).

1.2 Genes y proteínas involucrados en el desarrollo del cáncer

Hay muchos genes implicados en el desarrollo del cáncer. Además, estudios recientes han reportado nuevas clases de genes causantes de cáncer, así como nuevos genes. Por lo tanto, es necesario conocerlos, para el diagnóstico y posterior tratamiento de esta enfermedad (Lawrence et al., 2014).

Una de las primeras alteraciones genéticas identificadas en el cáncer humano fueron las del gen Ras. Las proteínas Ras participan en la señalización para el control de la proliferación celular,

la diferenciación y la supervivencia. Así, cualquier mutación en H-Ras, N-Ras, K-Ras u otra proteína de la vía Ras/MAPK, tiene como consecuencia la proliferación descontrolada (Fernández-Medarde & Santos, 2011).

La proteína p21 que regula negativamente la progresión del ciclo celular, puede presentar propiedades oncogénicas independiente de p53, aunque su mecanismo aún no está claro, hay estudios que indican que la presencia no convencional de p21 en el citoplasma inhibe las proteínas proapoptóticas. También se propone que la alteración de p21 desregula el proceso de licencia de replicación, lo que conduce a la inestabilidad genómica (Galanos et al., 2016).

Otro gen que al sufrir mutaciones conduce al desarrollo de cáncer, es el de retinoblastoma (Rb).

La proteína Rb es un regulador negativo del ciclo celular, de esta forma, cuando sufre alteraciones no puede interactuar con los factores de transcripción E2F, y se genera la división celular de una forma descontrolada. No obstante, la función de Rb también se puede inhibir si hay mutaciones o sobreexpresión de sus reguladores, como lo son la ciclina D1, la proteína CDK4 y su inhibidor p16^{INK4A} (Hu, Zhang, Bergholz, Sun & Xiao, 2016).

La telomerasa es un complejo que está sobreexpresado en un 85 a 90% de todos los cánceres, y funciona diferente en las células cancerosas respecto a las sanas. Esta enzima es necesaria para mantener la estabilidad cromosómica y cuando está activa constantemente puede hacer que las células se dividan infinitamente (Armstrong & Tomita, 2017).

El gen TP53 se encuentra mutado en diferentes tipos de cáncer, lo que genera la expresión de proteínas P53 con mutaciones. Cuando la proteína P53 está mutada pierde su actividad supresora de tumores, promoviendo la división de las células cancerosas (Muller & Vousden, 2014). Además, la alteración de P53 puede activar genes como el protooncogen Myc, que también puede sufrir mutaciones y está sobreexpresado en gran variedad de tumores. Dicho gen

participa en el control del ciclo celular, ya que induce genes que codifican ciclinas dependientes de quinasas (siglas en inglés: CDK), ciclinas (c), factores de transcripción E2F, y aumenta la actividad de los complejos c/CDK mediante la inducción de quinasa activadora de CDK (siglas en inglés: CAK) y fosfatasas Cdc25. Además, antagoniza la actividad de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27 (Bretones, Delgado, & León, 2015). Por lo tanto, la actividad descontrolada de Myc promueve una mayor activación del ciclo celular generando el estado neoplásico (Miller, Thomas, Islam, Muench & Sedoris, 2012). Sin embargo, el ciclo celular es un objetivo atractivo para el diagnóstico y los tratamientos del cáncer (Williams & Stoeber, 2012).

De esta manera, es de gran importancia conocer como está regulado el ciclo celular en células eucariotas y sus puntos de control. A continuación, se explican su función y sus etapas, así como la función que cumplen los genes y las proteínas involucrados en su regulación.

1.3 Ciclo celular

El ciclo celular es el conjunto de eventos que estimulan a una célula del cuerpo humano a dividirse de una forma adecuada y bajo regulación. Así, dicha célula distribuye su material genético para formar dos células hijas idénticas. En eucariotas, este proceso es el responsable de hacer reemplazos de células perdidas por edad, lesiones y enfermedades (Cruz, Mendiola y Soto Cruz, 2014); y consta de la interfase y la mitosis como se observa en la figura 1. La interfase está conformada por las fases G₁, S y G₂. En G₁ la célula incrementa su tamaño y su material intracelular e ingresa a la síntesis (S), en la cual se replica el ADN nuclear, luego, en G₂ la célula continúa incrementando su tamaño y finalmente, en la mitosis (M) las cromátidas se separan y distribuyen a las dos células hijas (Harashima, Dissmeyer & Schnittger, 2013). Todas estas fases son reguladas

por CDKs y sus proteínas activadoras las ciclinas. La activación de estos complejos c/CDK es inducida por señales mitogénicas e inhibidas cuando hay daño en el ADN (Otto & Sicinski, 2017).

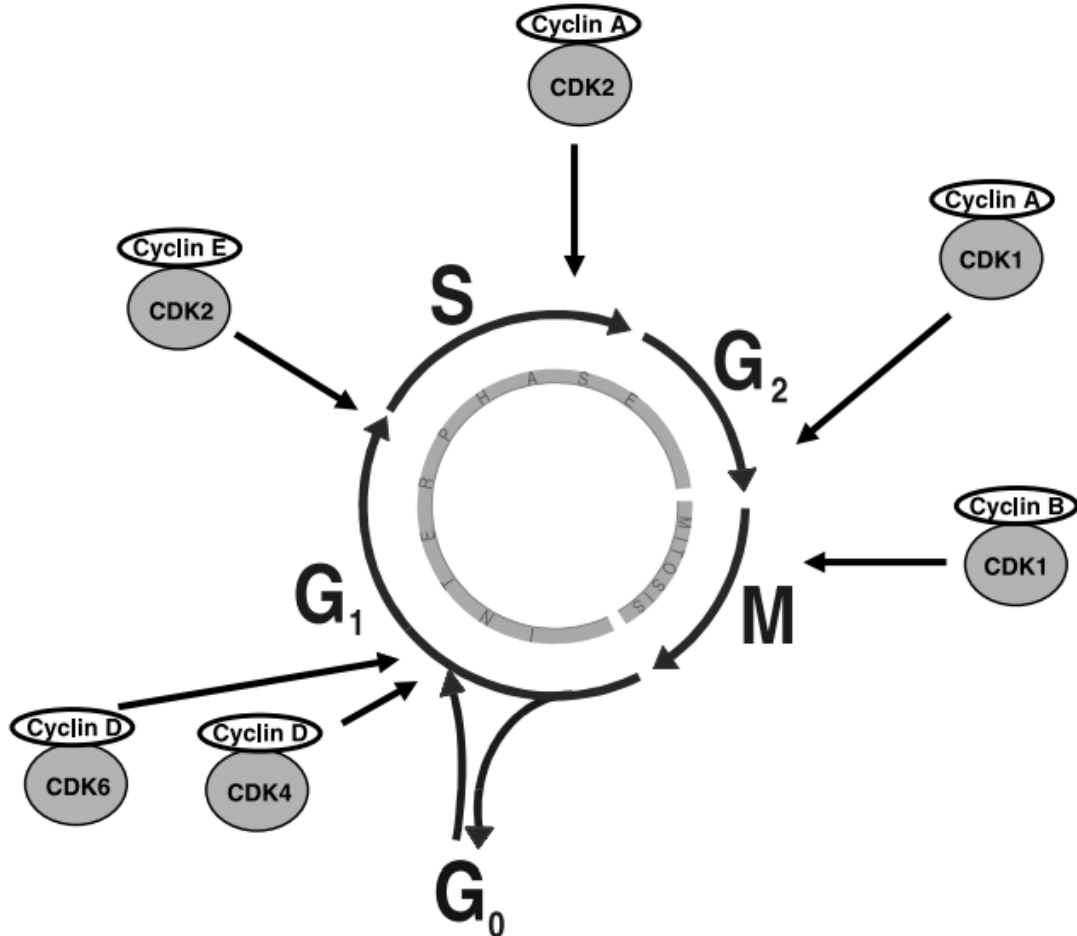


Figura 1. Ciclo celular eucariota. Adaptado de (Vermeulen, Van Bockstaele & Berneman, 2003).

En G₁ se forman los complejos cD/CDK4 ó cD/CDK6, los cuales fosforilan la proteína retinoblastoma (Rb) y proteínas relacionadas con retinoblastoma como p107 y p130, lo que genera la liberación factores E2F, posteriormente se transcriben y activan las ciclinas E y A, necesarias para la progresión del ciclo celular. Para finalizar G₁, el complejo cE/CDK2 completa la fosforilación de Rb que resulta en una mayor activación de la transcripción mediada por E2F y el paso a la fase S, donde se activa el complejo cA/CDK2 que fosforila las proteínas

implicadas en la replicación del ADN. Para el inicio de la profase se activa el complejo cA/CDK1 y finalmente el complejo cB/CDK1 completa la mitosis (Satyanarayana & Kaldis, 2009).

Por otro lado, el ciclo celular puede ser detenido por los inhibidores de CDKs (siglas en inglés: CKI). La familia de inhibidores de CDK₄ (siglas en inglés: INK₄) comprende p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D}. Estos inhiben a CDK4 y CDK6 impidiendo su unión a las ciclinas D. Además, los tres miembros de la familia de proteínas que interactúan con CDK (siglas en inglés: CIP) y proteínas inhibidoras de cinasas (siglas en inglés: KIP) p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2} inhiben un amplio conjunto de complejos c/CDK, lo que puede generar la detención en cada fase del ciclo celular (Lu & Hunter, 2010; Karimian, ahmadi & Yousefi, 2016).

Así, el ciclo celular está regulado positivamente para dividir la célula, pero cuando hay daños o defectos en el ADN, hay una vía regulada por el gen p53 que detiene el ciclo, conduciendo la célula a entrar en senescencia y morir, como mecanismo de defensa para que las secuencias de ADN dañadas no pasen a las células hijas (Li et al., 2012).

1.4 Muerte celular

La muerte de una célula se asocia a la pérdida irreversible de la integridad de su membrana plasmática (Golstein & Kroemer, 2007), y aunque no son claros los mecanismos que controlan este suceso, se han planteado diferentes tipos de muerte celular por criterios morfológicos y bioquímicos, como Piroptosis, parthanatos, ferroptosis, catástrofe mitótica, entosis, necroptosis y las más estudiadas que son la apoptosis, la autofagia y la necrosis (Ramírez Agudelo y Rojas López, 2010; Galluzzi et al., 2018).

1.4.1 Apoptosis. La apoptosis es una muerte celular controlada que genera un reemplazo de las células dañadas, ya sea durante el desarrollo o por daño en el ADN. La desregulación del

programa apoptótico es característico en las células cancerígenas, además, dicha desregulación también es responsable de la resistencia de tumores a las terapias (Pistritto, Trisciuglio, Ceci, Garufi & D'Orazi, 2016), Así, el conocimiento de esta vía de muerte celular programada y su inducción controlada artificialmente se propone como una posibilidad para contrarrestar las células cancerígenas (Espinosa, 2014).

Las células que sufren apoptosis experimentan cambios morfológicos y bioquímicos característicos como: contracción nuclear, condensación de la cromatina, degradación de ADN genómico, contracción de la célula, desprendimiento de cuerpos apoptóticos y activación de hidrolasas que degradan la mayoría de las macromoléculas de la célula (Giansanti, Torriglia & Scovassi, 2011; Mariño, Niso-Santano, Baehrecke & Kroemer, 2014; Nikolettou, Markaki, Palikaras & Tavernarakis, 2013)

Este tipo de muerte celular se puede inducir por dos vías, una extrínseca mediada por receptores de membrana y una intrínseca mediada por la mitocondria como se muestra en la Figura 2. La vía extrínseca se activa cuando ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (siglas en inglés: TNF) se unen a los receptores de muerte (siglas en inglés: DR) de la membrana plasmática, que incluyen TNFR-1, Fas/CD95, TRAIL DR-4 y DR-5. Los receptores poseen un dominio de muerte (DD) y reclutan otras proteínas que contienen dicho dominio, como la proteína de dominio de muerte TNFR tipo 1 (siglas en inglés: TRADD) y la proteína asociada a Fas con dominio de muerte (siglas en inglés: FADD), las cuales reclutan las caspasas iniciadoras -8 y -10 causando su dimerización para luego formar el complejo de señalización inductor de la muerte (siglas en inglés: DISC), y finalmente, se activan las caspasas efectoras -3, -6 y -7, dando paso a la degradación celular en la última etapa de la apoptosis (Mukhopadhyay, Panda, Sinha, Das, & Bhutia, 2014).

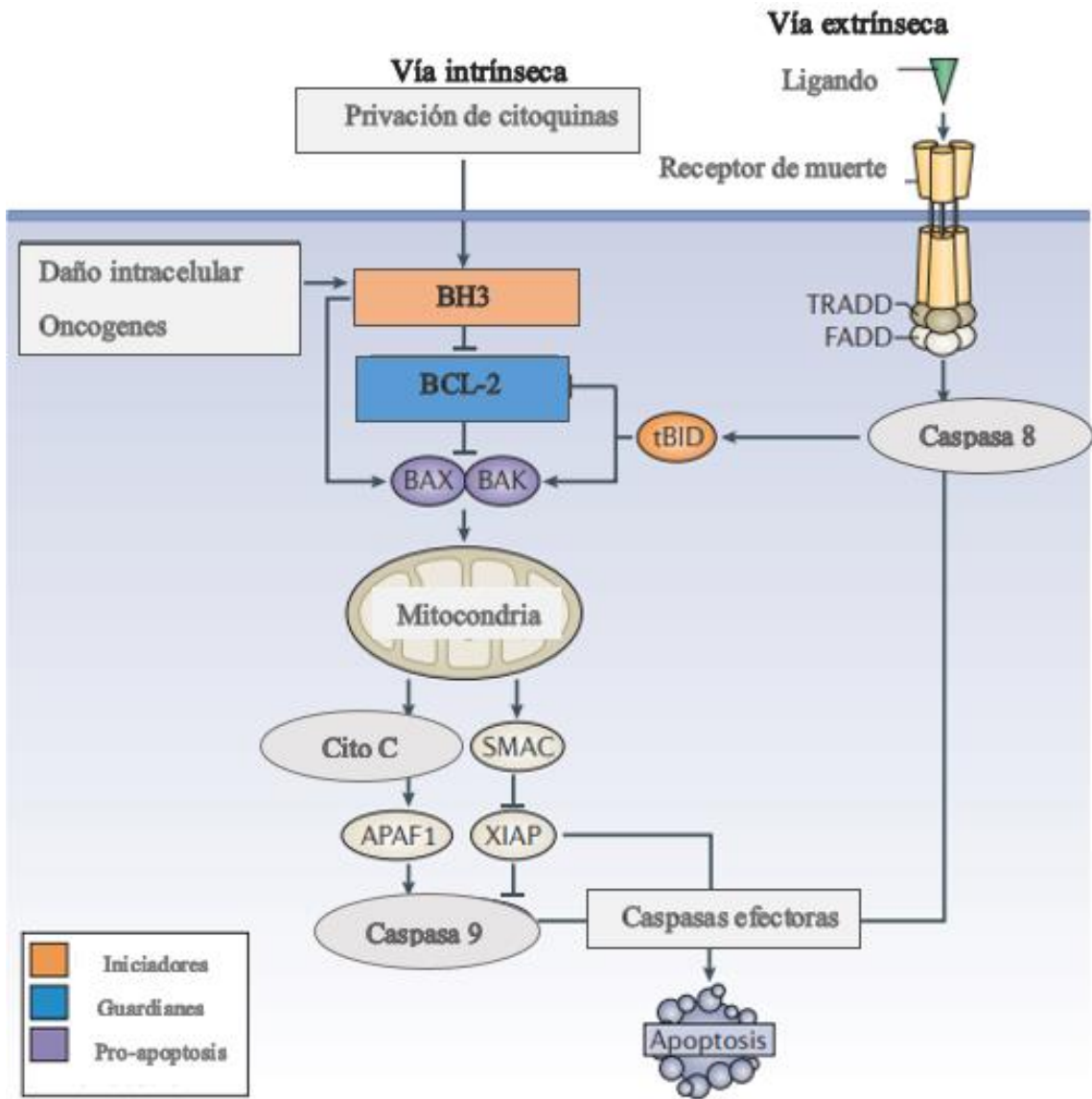


Figura 2. Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Adaptado de (Czabotar, Lessene, Strasse & Adams, 2014).

Así mismo, la vía intrínseca mediada por la mitocondria, se inicia por estímulos celulares como daño al ADN, estrés oxidativo y privación del factor de crecimiento (Ashkenazi, Fairbrother, Levenson & Souers, 2017). Esta vía está regulada por la superfamilia de proteínas Bcl-2, de las

cuales, se activan las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak. Estas se insertan en la membrana mitocondrial externa, alterando su potencial y su permeabilidad, lo que permite el paso de las proteínas confinadas en el espacio inter-membrana al citosol (Rathore, McCallum, Varghese, Florea & Büsselberg, 2017). Entre estas proteínas se encuentran el factor inductor de apoptosis (siglas en inglés: AIF), el segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (siglas en inglés: SMAC), la proteína de unión directa a proteínas inhibidoras de la apoptosis (siglas en inglés: IAP) con bajo punto isoelectrico (siglas en inglés: DIABLO), la proteína A de alta temperatura (siglas en inglés: Omi/HtrA2), y el citocromo c que se une al factor 1 activador de la proteasa de apoptosis (siglas en inglés: Apaf-1) e inicia la formación del apoptosoma, el cual recluta y activa a la procaspasa -9. Luego, se activan las caspasas ejecutoras -3, -6 y -7, que actúan sobre sustratos celulares específicos para dismantelar la célula. Sin embargo, existen las proteínas inhibidoras de la apoptosis, un ejemplo es el inhibidor XIAP que se une e inhibe a las caspasas ejecutoras y previene la activación de la caspasa -9. Las IAPs están altamente expresadas en el cáncer, pero pueden ser inhibidas por las proteínas mitocondriales Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO (Pistritto et al., 2016).

La inducción de la apoptosis también puede llegar a la mitocondria proveniente de los receptores de muerte a través de la proteína BID, que pertenece a la familia BCL-2 y bajo la acción de la caspasa 8 sufre proteólisis para generar el fragmento tBID, que puede guiar la apoptosis por la vía intrínseca (Czabotar et al., 2014).

Del mismo modo, la iniciación de la apoptosis puede darse por medio de la proteína de translocación mitocondrial (siglas en inglés: TP50), la cual interactúa con el canal aniónico dependiente de voltaje (siglas en inglés: VDCA), y al parecer genera especies reactivas de oxígeno que inducen la activación de la vía mitocondrial apoptótica (Sánchez y Arboleda,

2008). Otras proteínas que pueden inducir la apoptosis y, además, independientemente de las caspasas, son las proteínas AIF y la endonucleasa G (ENDOG) que se trasladan al núcleo y participan en la fragmentación del ADN (Galluzzi et al., 2012).

1.4.2 Autofagia. La muerte por autofagia juega un papel crucial en procesos fisiológicos como el hambre o estrés debido a la privación del factor de crecimiento, la diferenciación celular, la supervivencia celular y la muerte. Este mecanismo es lento e inicialmente afecta a orgánulos y compartimientos celulares, y durante su progresión algunas porciones del citoplasma quedan aisladas dentro de una vacuola de doble membrana y son digeridas por hidrolasas lisosomales (Ouyang et al., 2013; Ramírez Agudelo y Rojas López, 2010). Además, este tipo de muerte celular puede ser responsable de la desaparición de algunas células cancerígenas (especialmente cuando carecen de reguladores apoptóticos como BAX, BAK o caspasas) que responden a unos agentes quimioterapéuticos *in vitro* (Galluzzi et al., 2012). Sin embargo, en tumores agresivos y que presentan metástasis, la autofagia puede ser responsable de la resistencia farmacológica (Peña-Sanoja y De Sanctis, 2013).

En las células eucariotas hay tres tipos de muerte autofágica: la mediada por cheperonas CMA (de sus siglas en inglés: Chaperone-Mediated Autophagy), microautofagia y macroautofagia. La CMA es altamente específica, y está regulada positivamente por el estrés oxidativo leve, las toxinas que dañan las proteínas y la privación de nutrientes. En este mecanismo las proteínas del sustrato que contienen el pentapéptido KFERQ interactúan con la proteína 8 de choque térmico hsc70. De esta forma, el complejo sustrato/hsc70 atraviesa la membrana lisosomal con ayuda de la proteína de membrana lisosomal LAMP-2A (de sus siglas en inglés: Lysosome Associated Membrane Protein Type) y son degradadas en la luz lisosomal. Por otro lado, no está claro el proceso de regulación general de la AMC, pero sí que los cambios en los niveles

de LAMP-2A en la membrana lisosomal regulan la actividad de la CMA (Parzych & Klionsky, 2014).

La microautofagia en levaduras implica la absorción del citoplasma dentro del lisosoma a través de una invaginación en la membrana. Pero este mecanismo aún no se ha caracterizado bien en células animales ni se ha definido cuales son las proteínas implicadas o los posibles roles en la salud humana y las enfermedades (Ramírez Agudelo y Rojas López, 2010; Parzych & Klionsky, 2014). Por otra parte, la macroautofagia es un proceso más conocido, pero que aún no quedan claros algunos detalles de su mecanismo. Esta es inducida por el estrés, y se presenta catálisis de proteínas como una estrategia de supervivencia en condiciones de baja disponibilidad de aminoácidos. Inicialmente, las organelas intracelulares y el citosol son secuestrados en el interior de una vesícula esférica de doble membrana llamada autofagosoma, el cual es formado por expansión. Luego, esta vesícula se fusiona con la vacuola lisosomal, en donde las macromoléculas son degradadas y después se produce el reciclaje para reponer la célula con nutrientes para los procesos anabólicos. De este modo, la acumulación de autofagosomas y autolisosomas es un marcador morfológico de la macroautofagia. Aunque este mecanismo tiene una función principal de proteger el citoplasma, también puede conducir a la muerte celular durante el desarrollo normal como en la enfermedad (Johansen & Lamark, 2011; Peña-Sanoja y De Sanctis, 2013; Nikolettou et al., 2013).

1.4.3 Necrosis. La necrosis durante años se ha definido como un modo de muerte celular incontrolado, donde las células se hinchan, se pierde la integridad de la membrana celular y se produce la fuga del contenido celular (Chen, X. et al., 2014). Sin embargo, recientemente se encontró que la necrosis se puede dar bajo regulación, como respuesta al daño por alquilación del ADN, exposición a ciertas toxinas o patógenos, la unión de algunos ligandos a receptores

de membrana o exposición a especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés: ROS). Donde se produce una fuga celular caracterizada morfológicamente por granulación citoplasmática e hinchazón celular. Además, existen varios tipos de necrosis regulada que comparten estas características, pero se inician por diferentes estímulos y sus vías moleculares son diferentes (Soriano et al., 2017).

La necroptosis, una vía regulada de la necrosis, es una forma de muerte celular independiente de caspasas. Se puede desencadenar por los receptores de muerte TNF y es controlada por la unión de la pseudokinasa MLKL (del inglés: Mixed Lineage kinase like) con la quinasa RIPK3 (del inglés: Receptor-Interacting serine/threonine-Protein Kinase 3) (Pasparakis & Bandenabeele, 2015). Cuando la necroptosis es iniciada por el receptor TNFR1, RIPK3 es activado con RIPK1 (sí la caspasa 8 está inactiva) a través de la interacción de sus dominios Rhim (de sus siglas en inglés: RIP homotypic interaction motif). Luego, RIPK3 participa en la fosforilación de MLKL para formar oligómeros que se dirigen a la membrana plasmática para unirse a determinadas especies de fosfatidilinositol fosfato, y así, causar la permeabilización de la membrana, permitiendo la salida del contenido celular y la muerte de la célula (Galluzzi et al., 2018).

La muerte celular en general, es el objetivo de los tratamientos contra el cáncer. Ya sea por cualquier vía, lo que se busca es inducir la muerte de las células malignas para reducir o desaparecer el tumor. No obstante, es preferible que la terapia desencadene una muerte regulada que no genere inflamación, debido a que hay estudios que le otorgan a la inflamación efectos tumorogénicos, aunque, diversos estudios también le han atribuido la restricción del crecimiento del cáncer (Bonavita, Pelly & Zelenay, 2018).

Por lo tanto, conocer como inducir la muerte de las células cancerígenas ha sido y continúa siendo de gran importancia en el desarrollo de terapias para el tratamiento del cáncer, De esta manera, seguidamente se exponen las terapias que se usan en la actualidad para controlar y tratar de curar el cáncer.

1.5 Tratamiento del cáncer

El número de sobrevivientes de cáncer ha aumentado en las últimas décadas debido a las mejoras en su detección y tratamiento. Las terapias más utilizadas para esta enfermedad consisten en la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Además, dependiendo de la edad del paciente, del tipo de cáncer y de que tan avanzado esté, los tratamientos pueden combinarse de distintas formas (DeSantis et al., 2014).

La cirugía y la radioterapia son las terapias más utilizadas para tratar tumores sólidos. Aunque, cuando el cáncer alcanza la etapa de la metástasis, una terapia como la quimioterapia se debe aplicar a las células cancerígenas difundidas (Shi, Alagoz, Erenay, & Su, 2014). Entre los fármacos empleados en esta terapia se encuentran los complejos de platino mostrados en la figura 3 y la camptotecina mostrada en la figura 4, entre otros (López, Ensuncho & Robles, 2013; Min et al, 2008; Sánchez-Cano & Hannon, 2009; Soukasene et al, 2011).

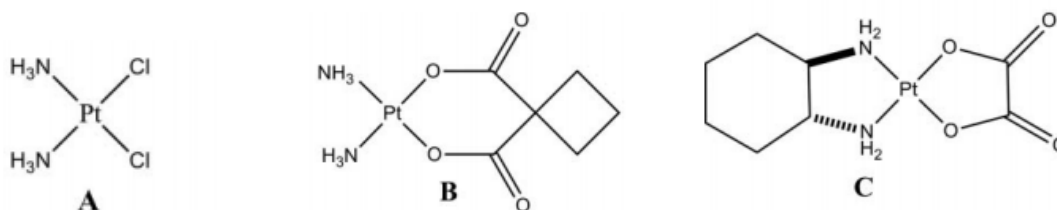


Figura 3. Estructuras de los complejos cisplatino (A), carboplatino (B), y oxaliplatino (C). Adaptado de (Sánchez-Cano & Hannon, 2009)

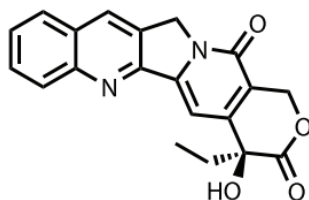


Figura 4. Estructura molecular de la camptotecina. Adaptado de (Soukasene et al, 2011).

Sin embargo, muchos de los fármacos empleados en quimioterapia presentan baja selectividad, y como consecuencia, inducen la muerte tanto a las células cancerígenas como a las normales, generando efectos secundarios que afectan a distintos órganos (Shi et al., 2014). Por otro lado, las células tumorales también pueden desarrollar resistencia a los fármacos durante el tratamiento, evitando la total aniquilación de estas y el fracaso de la quimioterapia (Holohan, Van Schaeybroeck, Longley & Johnston, 2013; Shi et al., 2014). La resistencia puede ser intrínseca o adquirida. La primera se da porque los factores mediadores de la resistencia existen en la mayoría de las células tumorales haciendo el tratamiento inefectivo. Mientras que la resistencia adquirida se desarrolla durante el tratamiento de tumores, que inicialmente son sensibles al fármaco, y es causada por mutaciones surgidas en la terapia o a través de otras respuestas adaptativas (Holohan et al., 2013).

A pesar de los avances en los tratamientos del cáncer, se necesita continuar con la búsqueda de compuestos más potentes, selectivos y con diferentes dianas farmacológicas, para resolver los problemas relacionados a los efectos secundarios y la resistencia a los fármacos. En esta búsqueda se postulan una diversidad de nuevos compuestos, entre estos se encuentran las tiazolidinas, 1,2,3-triazoles, isoxasoles, tetrahydroquinolinas (THQ) e isoxazolininas.

1.6 Triazoles, Tiazolidinas, isoxazoles, Tetrahidroquinolinas e isoxazolininas

La necesidad de encontrar nuevos compuestos biológicamente activos continúa creciendo, y los investigadores apenas están comenzado a explorar el vasto conjunto de compuestos potencialmente activos. En la búsqueda de mejores fármacos, se debe afrontar el arduo trabajo de preparar nuevas moléculas, combinando la alta actividad anticancerígena y la selectividad del fármaco, además de buenas propiedades farmacocinéticas.

Como posibles soluciones se proponen diversos compuestos, entre estos están los 1,2,3-triazoles, las tiazolidinas, los isoxazoles, las tetrahidroquinolinas y las isoxazolininas, en este trabajo se evaluaron híbridos derivados de estos farmacóforos. Así, las actividades biológicas atribuidas a cada grupo de compuestos serán descritas a continuación.

1.6.1 1,2,3-Triazoles y su importancia biológica. Los 1,2,3-triazoles cuya estructura se muestra en la figura 5, son unidades de unión atractiva porque son estables a la degradación metabólica y pueden formar puentes de hidrógeno, lo que los hace favorables en la unión a dianas biomoleculares. Derivados de estos compuestos han presentado diversas actividades biológicas (Dheer et al., 2017), y aunque la estructura 1,2,3-triazole no se encuentran en la naturaleza, se han sintetizado fármacos derivados, que incluyen el compuesto anticanceroso CAI mostrado en la figura 6, el derivado nucleósido no inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósida conocido como TSAO, el antibiótico Tazobactam β -lactum, y la cefalosporina cefatrizina entre otros (Agalave, Maujan & Pore, 2011).

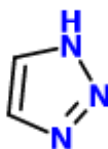


Figura 5. Anillo de 1,2,3-triazol

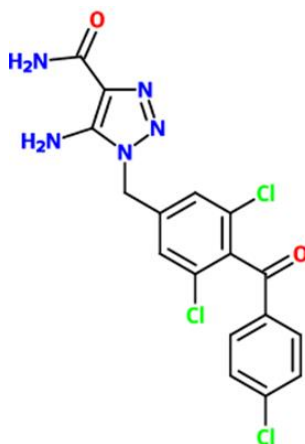


Figura 6. Estructura del compuesto anticancerígeno CAI

Además, se han realizado diversas investigaciones con derivados de 1,2,3-triazoles, encontrando buenos resultados en lo que respecta a actividad anticancerígena en líneas celulares A549, PC-3, TPH-1, Caco-2, B16F10, MGC-803 y MCF-7 (Bratsos et al., 2011; Duan et al., 2013; Ma et al; 2015; Singh et al., 2012).

Bratsos et al. (2011) evaluó la actividad anticancerígena de una serie de complejos de rutenio que contienen la estructura 1,2,3-triazol entre sus ligandos, y encontró un valor de IC₅₀ de 60±17 μM a 24 horas, y 80±3 μM a 72 horas para el complejo que se muestra en la figura 7, el cual fue evaluado en la línea celular A549.

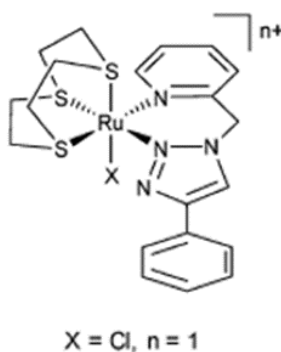


Figura 7. Estructura del catión del complejo [Ru([9]aneS3)Cl(ppt)][CF₃SO₃]. Adaptado de (Bratsos et al., 2011).

Por otro lado, Singh et al. (2012) avaluó la citotoxicidad de una familia de híbridos de 1,2,3-triazoles- β -lactama-chalcona, encontrando efectos citotóxicos para todos los compuestos, y en especial para el compuesto que se muestra en la figura 8, el cual presentó un IC₅₀ <1 μ M en células A549, un IC₅₀ igual a 67,1 μ M en células PC-3, un IC-50 <1 μ M en células THP-1 y un IC₅₀ igual a 6,37 μ M en células Caco-2.

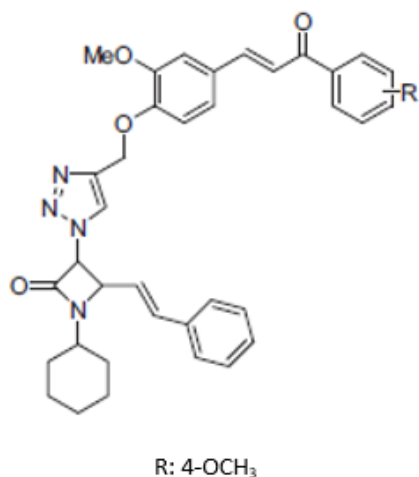


Figura 8. Estructura del compuesto 1-ciclohexil-3(RS)-(4-{2-metoxi-4-[3-(4-metoxifenil)-3-oxo-propenil]fenoximetil}-[1,2,3]triazol-1-il)-4(SR)-estiril-azetidina-2-ona. Adaptado de (Singh et al., 2012).

Dheer et al. (2017) reportó que el 2-metoxi-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-5-il)anilina mostrado en la figura 9, inhibió la polimerización de tubulina con un IC₅₀=4,8 μ M. Los estudios mostraron que el compuesto interactúa con varios aminoácidos de la β -tubulina por medio de enlaces de hidrógeno.

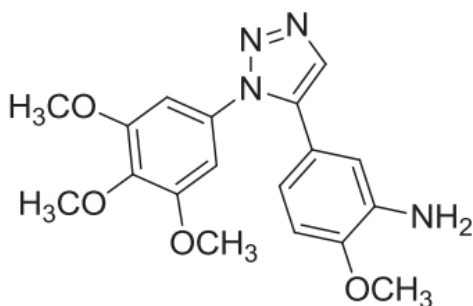


Figura 9. Estructura del 2-metoxi-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-5-il)anilina. Adaptado de (Dheer et al., 2017).

1.6.2 Tiazolidinas y su importancia biológica. Otras estructuras importantes por sus propiedades farmacológicas y que se pueden encontrar en la naturaleza son las tiazolidinas (Zhang, Zhou, Zhai & Yan, 2010), compuestos orgánicos heterocíclicos de 5 miembros, que contienen un átomo de azufre y un átomo de nitrógeno en su primera y tercera posición respectivamente, como se muestra en la Figura 10 (Onen-Bayram, Buram, Durmaz, Berk & Cetin-Atalay, 2015; Pandey, Sharma, Kumar & Singh, 2011).

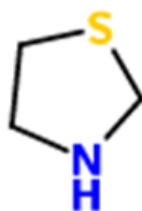


Figura 10. Anillo de tiazolidina

Desde la última década una gran cantidad de trabajos se han desarrollado en torno al anillo de tiazolidina, evaluándolo para diferentes actividades farmacológicas, presentándose especial interés sobre sus propiedades anticancerígenas, esto con el fin de obtener una molécula que cuente con una buena actividad y con menos efectos adversos. Estos productos naturales no

sólo se han utilizado como fármacos, sino que también inspiró la generación de innumerables compuestos sintéticos que tienen productos naturales como farmacóforos (Pandey et al., 2011). Las tiazolidinas han demostrado su importancia como agentes antimicrobianos, antiinflamatorios, anticonvulsivos, antimaláricos, analgésicos, anti-VIH y anticancerígenos (Beharry et al., 2009; Havrylyuk et al., 2011; Pandey et al., 2011; Tatar, Küçükgülzel, De Clercq, Şahin & Güllüce, 2008; Zhang et al, 2010). Además, se ha encontrado que híbridos de tiazolidindiona/1,2,3-triazol presentan actividad antibacteriana in vitro, y actividad antifúngica (Sindhu, Singh, Khurana, Sharma & Aneja, 2015). Otros estudios muestran excelentes propiedades anticancerígenas para estas moléculas, por ejemplo, el compuesto AL67 mostrado en la figura 11, que presentó citotoxicidad en células de cáncer de hígado, colon, mama y endometrio. Además, su análisis en células de hígado demostró que detuvo el ciclo celular en SubG1/G1, e indujo apoptosis mediante la activación de la caspasa-9, aunque su mecanismo de acción exacto no se conoce (Onen- Bayram, Durmaz, Scherman, Herscovici, & Cetin-Atalay, 2012).

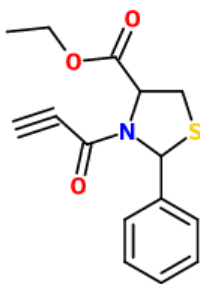


Figura 11. Estructura molecular del compuesto AL67

Por otro lado, Romagnoli et al. (2013) evaluó la actividad anticancerígena de una serie de compuestos de arilideno-tiazolidina-2,4-dionas N-3-sustituidas, y observó que los compuestos a, b y c de la Figura 12 suprimen la proliferación de células HL-60 y U937 de leucemia mieloide humana, provocando cambios morfológicos, y fragmentación de ADN internucleosomal, lo que

indica muerte por apoptosis asociada a un mecanismo de acción con activación de múltiples caspasas y liberación de citocromo c.

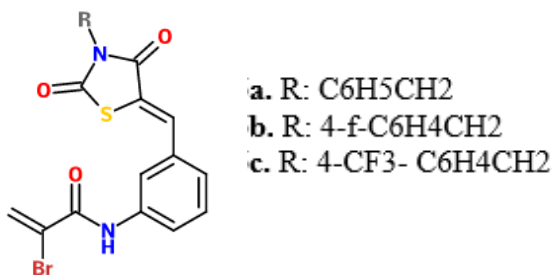


Figura 12. Estructura de los compuestos arilideno-tiazolidina-2,4-dionas N-3-sustituidas

1.6.3 Isoxazoles y su importancia biológica. El isoxazol presenta una estructura de cinco miembros, que contiene un átomo de oxígeno y un átomo de nitrógeno en las posiciones 1 y 2 respectivamente, como se muestra en la figura 13 (Ajay Kumar & Jayaroopa, 2013). Estos heterociclos se emplean en gran medida en el área de productos farmacéuticos y terapéuticos tales como insecticidas, antibacterianos, antibióticos, antiinflamatorios, antitumorales, antimicóticos, antituberculosos, anticancerosos, y ulcerogénicos. Algunos ejemplos de estos fármacos comerciales son: valdecoxib (analgésico), leflunomida (anti artritis), cloxacilina (antibiótico) (Lavanya, Reddy, Padmavathi & Padmaja, 2014), cicloserina (antibiótico), acivicina (antileishmania), y isoxaflutole (herbicida) (Ajay Kumar & Jayaroopa, 2013).

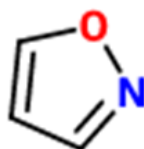


Figura 13. Anillo de isoxazol

Además, hay estudios que reportan buena actividad anticancerígena de los diferentes derivados de isoxazoles en las líneas celulares A549, HCT116, MCF-7, PANC1 y DU145 (Pedada et al.,

2006; Kumar et al., 2016; Yong, Lu & Wu, 2014). Yong et al. (2014) evaluó compuestos derivados de ferroceno que contienen la estructura del isoxazol, y encontró que el derivado mostrado en la figura 14, presentó actividad anticancerígena potente contra las líneas celulares A549 y HCT116 (IC₅₀: 0,747 nM y 3,65 nM, respectivamente), lo que lo postula como el mejor candidato de este estudio para el desarrollo de drogas contra el cáncer.

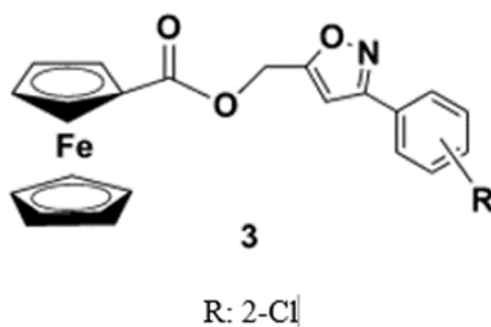


Figura 14. Estructura del éster 3-(2-cloro-fenil)-isoxazol-5-il-metil del ácido carboxílico de ferroceno. Adaptado de (Yong et al., 2014).

Por otro lado, Chen D. et al (2014) halló que el compuesto mostrado en la figura 15 inhibió la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer humano y presentó alta afinidad por la unión a la proteína HSP90, la cual está sobreexpresada en un amplio espectro de cánceres.

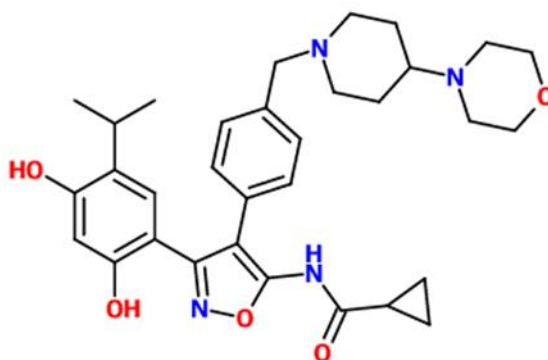


Figura 15. Estructura del compuesto N-(3-(2,4-dihidroxi-5-isopropilfenil)-4-(4-((4-morfolinopiperidin-1-il)metil)fenil)isoxazol-5-il)ciclopropanocarboxamidasas

1.6.4 Tetrahydroquinolinas y su importancia biológica. Los compuestos heterociclos de nitrógeno están presentes en cerca del 60% de todos los fármacos. Las tetrahydroquinolinas cuya estructura se muestra en la figura 16, se encuentran en productos naturales, principalmente en alcaloides, y forman parte de múltiples fármacos. Estas estructuras han mostrado actividad anti-VIH, anticancerígena, antiviral, antifúngica, antibacteriana, y también han presentado actividades interesantes en los canales iónicos (Sridharan et al., 2011).

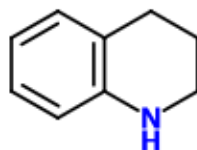


Figura 16. Estructura molecular de la tetrahydroquinolina

Diversos derivados de tetrahydroquinolinas presentan efectos citotóxicos y antiproliferativos en diferentes líneas celulares de cáncer (Nagaiah et al., 2010; Faidallah, Saqer, Alamry, Khan & Asiri, 2014; Gedawy, Kassab & El-Malah, 2015). Castillo et al. (2018) reportó que el compuesto de la figura 17 mostró actividad citotóxica en 57 líneas celulares cancerígenas, además, inhibió la proliferación sobre células de cáncer de colon HCT116, y los ensayos de mecanismo de muerte celular sobre las mismas células, indicaron que detuvo el ciclo celular en la fase S de una manera dependiente de la dosis.

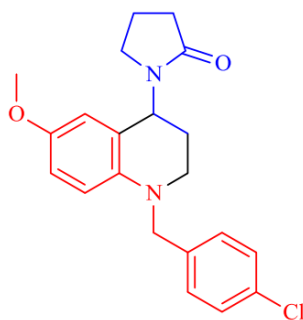


Figura 17. Estructura del compuesto (±)-1-(1-(4-Clorobencil)-1,2,3,4-tetrahidro-6-metoxiquinolona-4-il)pirrolidina-2-ona. Adaptado de (Castillo et al., 2018).

Por otro lado, Shang et al. (2018) encontró que el compuesto mostrado en la figura 18, puede inducir la senescencia de las células de cáncer de ovario. Este derivado detuvo el ciclo celular en G0/G1 en las células A2780 por medio de la activación de la vía de señalización p21 causando gran daño al ADN.

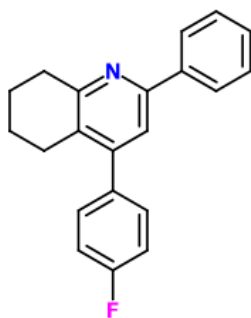


Figura 18. Estructura del 4-(4-Fluoro-fenil)-2-fenil-5,6,7,8-tetrahidroquinolina

1.6.5 Isoxazolininas y su importancia biológica. Las isoxazolininas también son compuestos heterocíclicos de 5 miembros, en sus posiciones 1 y 2 poseen un átomo de oxígeno y nitrógeno respectivamente, como se muestra en la figura 19 (Sadashiva et al., 2012). La estructura de estos compuestos se puede encontrar en la naturaleza, y presentan diversas actividades biológicas,

como actividad antitrombótica, antibacteriana, antidepresiva, antifúngica, antiviral, y antiinflamatoria (Prajapati et al., 2015).

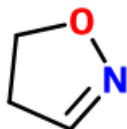


Figura 19. Anillo de isoxazolina

Además, los derivados de isoxazolina han adquirido en los últimos años gran importancia en la búsqueda de fármacos anticancerígenos (Kaur, Kumar, Sharma, & Gupta, 2014). Por ejemplo, Rasool et al. (2017) reportó que el compuesto derivado de isoxazolina que se muestra en la figura 20, presentó la citotoxicidad más potente de su estudio en células MCF-7 y HCT116 (CI_{50} : $0,705 \pm 0,059 \mu\text{M}$ y $1,25 \pm 0,156 \mu\text{M}$, respectivamente). También condujo las células a la senescencia prematura y detuvo el ciclo celular en G2/M. En estudios *in vivo* este compuesto inhibió en un 83,8% el crecimiento tumoral a una dosis de 25 mg/Kg en el modelo de carcinoma mamario de ratón. Lo que posiciona este derivado como un candidato potencial para inhibir la proliferación celular descontrolada en cáncer.

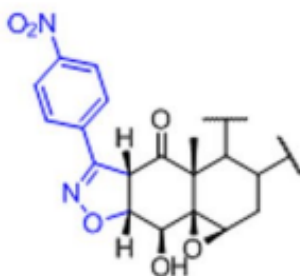


Figura 20. Estructura molecular del compuesto 4-nitrofenil-2-isoxazolin Witaferina A.

Adaptado de (Rasool et al., 2017).

Chaitanya et al. (2018) sintetizó una familia de indolisoxazolininas, en donde los compuestos 6c y 6i mostrados en la figura 21, presentaron citotoxicidad potente en varias líneas celulares de cáncer. Dichos compuestos indujeron apoptosis en las células de cáncer de próstata C4-2 e inhibieron su proliferación sin generar ROS, además de inhibir potentemente la migración celular.

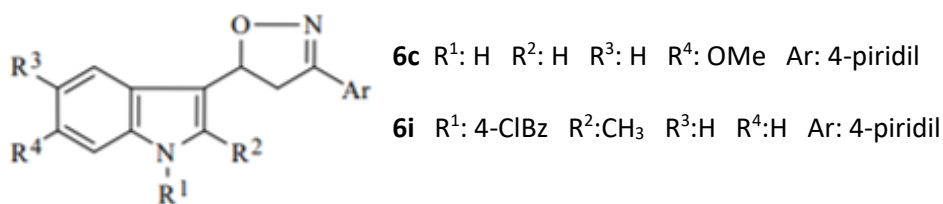


Figura 21. Estructuras de los compuestos 6c y 6i. Adaptado de (Chaitanya et al., 2018)

Con base en lo anterior, el grupo de investigación en compuestos orgánicos de interés medicinal CODEIM, sintetizó 5 compuestos de tiazolidina/1,2,3-triazol, 2 de tiazolidina/isoxazol, 1 de tiazolidina y 1 de THQ/isoxazolina. Para poder aportar al conocimiento de la actividad anticancerígena de los nuevos compuestos y el mecanismo de acción del compuesto más promisorio, se plantearon los siguientes objetivos y se desarrolló la metodología expuesta a continuación.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial anticancerígeno de nuevos híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol, y tetrahydroquinolina/isoxazolina sobre las líneas celulares HeLa, A549, MCF-7, HepG2 y B16F10.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto citotóxico de los nuevos híbridos moleculares sobre las líneas celulares HeLa, A549, MCF-7, HepG2 y B16F10.
- Analizar el efecto del compuesto más citotóxico sobre la proliferación celular.
- Estudiar el efecto causado por el híbrido molecular que presente mejor actividad citotóxica sobre la morfología celular.
- Evaluar la liberación de citocromo c del híbrido molecular con mejor actividad citotóxica.
- Evaluar el efecto del híbrido con mejor citotoxicidad sobre la externalización de fosfatidilserina.
- Analizar el efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial del híbrido que presente mejor citotoxicidad.

3. Materiales y métodos

La actividad anticancerígena de los híbridos se evaluó en las líneas tumorales HeLa, A549, B16F10, HepG2 y MCF-7. Inicialmente se realizó un análisis de viabilidad sobre las líneas celulares mencionadas, y con base en los resultados, se eligió el compuesto CB41 que presentó la mayor actividad citotóxica en la línea celular HeLa, para realizar un análisis de su efecto en la proliferación de las células. Posteriormente se realizaron pruebas de inducción de apoptosis mediante la liberación de citocromo c, externalización de fosfatidilserina y daño de potencial de membrana mitocondrial. Además, se realizó un análisis de morfología celular, con el objetivo de comprobar que la disminución en la viabilidad celular es producto de inducción de muerte celular programada.

Las familias de compuestos fueron sintetizados y caracterizados por los químicos Fausto Marín Guiza y Cristian Camilo Bernal del grupo de investigación en compuestos orgánicos de interés medicinal (CODEIM) (Ver apéndices).

3.1 Cultivo celular

Las células no tumorales Vero y las células tumorales HeLa (adenocarcinoma de cuello uterino humano), A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), B16F10 (melanoma murino), y MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) se cultivaron en medio EMEM, suplementado con 7% de suero fetal bovino, 100 µg/mL de gentamicina y pH de 7,4; incubadas a 37 °C y 5% de CO₂. Por otro lado, las células HepG2 (adenocarcinoma de hígado humano) se cultivaron bajo las mismas condiciones, pero con un suplemento de suero fetal bovino al 10%. Cabe mencionar que las líneas celulares fueron donadas por el laboratorio de oxidaciones biológicas de la Universidad Federal de Paraná, quienes a su vez las obtuvieron comercialmente de la ATCC (del inglés: American Type

Culture Collection), entidad que tiene más de 85 años de experiencia en el aislamiento, identificación y comercialización de células en cultivo. Del mismo modo, la línea celular MCF-7 fue donada por la fundación cardiovascular de Colombia, quienes a su vez también la obtuvieron de la ATCC.

3.2 Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó por el método del MTT de acuerdo a lo descrito por Mosmann (1983). Con este método las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio formando cristales de formazan, solubles en DMSO y que pueden ser cuantificados a 570 nm.

Las células se cultivaron en placas de 96 pozos (1×10^4 células/pozo) e incubaron a 37 °C con atmosfera de CO₂ (5%) durante 24 horas. Posteriormente se trataron las células con los compuestos preparados en medio de cultivo en concentraciones de 5, 25, 50 y 100 µM, manteniendo una concentración máxima de 0,1% de DMSO. Como control negativo se usaron las células sin tratamiento alguno y como fármaco de referencia se usó el oxaliplatino. Pasadas las 48 horas de tratamiento se descartó el sobrenadante, se adicionaron 200 µL de MTT (500 µg/mL en solución salina de Hanks), y se incubaron las células durante 3 horas. Finalmente se retiró el MTT y se agregaron 200 µL de DMSO para solubilizar los cristales formados. La absorbancia del formazan se midió a 570 nm en un lector de microplacas *MultiSkan Go-Thermo*.

3.3 Ensayo de proliferación celular

Se adicionaron 1×10^4 células/pozo en placas de 96 pozos, y se incubaron a 37 °C con atmosfera de CO₂ al 5%. Después de 24 horas, se retiró el sobrenadante y se trató con el compuesto CB41 (10 µM). Luego del tiempo de tratamiento (12-72 h), se descartó el medio, y se evaluó la proliferación celular por el método del cristal violeta (Brasaemle & Attie, 1988). Las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol durante 10 minutos, posteriormente se adicionaron 50 µL de solución de

crystal violeta (0,02%) en etanol (2%) y se dejó durante 5 minutos. Por último, las células se lavaron 4 veces con PBS y se adicionaron 200 μ L de citrato de sodio en etanol al 50%. La lectura de absorbancia se realizó a 540 nm en un lector de microplacas *MultiSkán Go-Thermo*.

3.4 Estudio Morfológico

Las células HeLa (100000 células /pozo) fueron cultivadas en placas de 12 pozos sobre portaobjetos circulares, y se incubaron a 37 °C con atmosfera de CO₂ (5%) durante 24 y 48 horas. Posteriormente, las células se trataron con el compuesto CB41 (10 μ M) y se incubaron durante 24 y 48 horas. Luego del tiempo de tratamiento, las células se lavaron con solución tampón de fosfato (PBS) y se fijaron con etanol al 70% (50 μ L por pozo). Se retiró el etanol y las células se tiñeron con GIEMSA (solución de hematoxilina y eosina). Finalmente, la morfología celular se observó a través de un microscopio óptico equipado con una cámara Leica IC50W.

3.5 Liberación de citocromo c

Para la detección de la liberación de citocromo c se usó la metodología descrita por Appaix et al. (2000). Las células (500000 células/pozo) se depositaron en cajas Petri de 6 cm de diámetro e incubaron por 24 horas a 37 °C con atmosfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se trataron con el compuesto CB41 (10 μ M). Después del tiempo de tratamiento (24 h), las células se soltaron con tripsina y se centrifugaron a 4500 xg por 15 minutos, seguidamente, se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS resuspendiendo, se tomó una alícuota de la suspensión y se cuantificó proteínas utilizando el método de Bradford (1976). La suspensión se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se agregó una solución de Tritón (0,01 mM) en Tris-HCl EDTA para incubar a 4°C durante 30 minutos. Por último, se centrifugó a 10000 xg por 30 minutos y el citocromo c liberado en el citosol se cuantificó a 414 nm en un espectrofotómetro *MultiSkán Go-Thermo*. Como control positivo se utilizó el fármaco camptotecina (5 μ M).

3.6 Ensayo de muerte celular utilizando *PE ANEXINA V/SYTOX GREEN* por Citometría de flujo

En placas de 12 pozos se cultivaron 1×10^5 células/pozo, se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente se trataron las células con el compuesto CB41 (10 µM) disuelto en medio de cultivo y DMSO 0,1%. Como control negativo se emplearon las células sin tratamiento alguno, y como control del experimento se utilizaron las células sin tratamiento y sin Anexina-Sytoox. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se soltaron con tripsina. Luego, la suspensión se centrifugó a 500 xg por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de PBS para resuspender las células y centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.

A las células se les adicionaron 100 µL de solución Anexina-Sytox (excepto al control del experimento) protegiéndolas de la luz, y se siguieron las indicaciones del kit *PE Annexin V/Dead Cell Apoptosis Ref. V35112* de *Invitrogen*. Al control del experimento se le agregaron 100 µL de solución 5x anexin-binding buffer. A continuación, se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y 5% de CO₂ protegiendo de la luz. Después, se agregaron a cada muestra 400 µL de solución 5x anexin-binding buffer y se pasaron las suspensiones a tubos de citometría dispuestos en una cubeta con hielo. Para finalizar, se pasó cada muestra en el citómetro de flujo FACS canto II midiendo la fluorescencia de emisión a 530 nm y 575 nm (adaptado del kit). Como control positivo se utilizó el fármaco camptotecina (5 µM).

3.7 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial usando Rodamina-123

Se cultivaron 1×10^5 células/pozo en placas de 12 pozos, se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 horas. Después se realizó el tratamiento con el compuesto CB41 (10 µM) disuelto en medio de cultivo y manteniendo un 0,1% de DMSO como máximo. Como control negativo se emplearon las células sin tratamiento alguno, y como control del experimento se utilizaron las células sin

tratamiento y sin rodamina. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se soltaron con tripsina. Luego, la suspensión se centrifugó a 500 xg por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, se agregó 1 mL de PBS para resuspender las células y centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.

A las células se les adicionó 1 mL de solución 5 μ M de rodamina (excepto al control del experimento) preparada en PBS, protegiéndolas de la luz. Al control del experimento se le agregó 1 mL de PBS. Posteriormente se incubó durante 15 minutos a 37 °C y 5% de CO₂ protegiendo de la luz. A continuación, se centrifugaron las células a 500 xg por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, y se resuspendieron en 1 mL de PBS para centrifugar de nuevo bajo las mismas condiciones (se repitió 2 veces). Las células lavadas se resuspendieron en 500 μ L de PBS y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Luego, las suspensiones de células se pasaron a tubos de citometría dispuestos en una cubeta con hielo. Finalmente, se realizaron las mediciones de cada muestra en el citómetro de flujo FACS canto II (canal de fluorescencia verde-530/30 nm) (Cury-Boaventura, Pompéia, & Curi, 2005). Como control positivo se utilizó el fármaco camptotecina (5 μ M).

3.8 Análisis estadístico

Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado para cada metodología, y todos los resultados están presentados como la media \pm desviación estándar de la media. El análisis estadístico de los datos se determinó realizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido por el test de Tukey para la comparación de promedios. Los resultados serán considerados estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$. El programa utilizado fue GraphPad Prism 5 (Versión 5.03, 2009).

4. Resultaos y discusión

Se evaluaron ocho híbridos moleculares tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol, THQ/isoxazolina y 1 derivado de tiazolidina (ver apéndices). Donde todos los derivados de tiazolidina tienen un sustituyente metilcarboxilato. Además, FM113 tiene un propioloil y FM102, FM78, FM66 y FM97 un trimetoxifenil. Por otro lado, los derivados de 1,2,3-triazol FM97 y FM141, poseen un sustituyente metilfenil, FM102 un nitrofenil, FM115 un etilfenil y FM127 un fenil. Los derivados de isoxazol FM78 y FM66 tienen sustituyentes dimetoxifenil y metoxifenil respectivamente. El híbrido de THQ/isoxazolina CB41 tiene un sustituyente metil y un 2-pirrolidona en la THQ, mientras en el anillo de isoxazolina tiene un trimetoxifenil.

4.1 Efectos de los híbridos sobre la viabilidad y la proliferación celular

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la citotoxicidad de los híbridos, expresados como la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), y los resultados para el efecto del híbrido más citotóxico sobre la proliferación celular.

4.1.1 Efecto de los híbridos en la viabilidad celular. En el ensayo de reducción de MTT, las deshidrogenasas de las células viables y metabólicamente activas reducen la sal MTT produciendo cristales de formazan, solubles en DMSO, y que pueden ser cuantificados a 570 nm. La cantidad de formazan es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Escobar & Aristizábal, 2010; Stockert, Blázquez-Castro, Cañete, Horobin & Villanueva, 2012).

Inicialmente se realizó el ensayo del MTT en las células tratadas a 48 horas con los 9 compuestos (ver apéndices) y con cuatro concentraciones de cada uno (5, 25, 50 y 100 μ M), en donde la concentración máxima fue 100 μ M.

La viabilidad celular se determinó mediante la ecuación 1 (Stockert et al., 2012). En donde la absorbancia es representada por la letra 'A'.

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \frac{A_{\text{tratamiento}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{Control}} - A_{\text{blanco}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

En la **tabla 1** se muestran las CI_{50} para cada compuesto en las diferentes líneas celulares cancerígenas y en la línea celular no cancerígena Vero, así mismo, se usó el oxaliplatino como control positivo, y se halló su CI_{50} en las líneas celulares en las que los compuestos presentaron citotoxicidad. Este fármaco de platino ha mostrado que genera muerte celular en líneas de cáncer de colon, vejiga, ovario y piel, entre otros. Además, ha sido usado en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal (Arango et al., 2004; Raymond, Chaney, Taamma & Cvitkovic, 1998).

De los derivados de tiazolidina, el compuesto (4R)-Metil-3-propiloil-tiazolidin-4-carboxilato (FM113) presentó citotoxicidad en dos líneas celulares. Sin embargo, los compuestos híbridos que contienen la estructura de tiazolidina no presentaron actividad citotóxica. El derivado FM113 al igual que los híbridos posee un metilcarboxilato en el carbono cuatro (C4) del anillo de tiazolidina y no posee un grupo sustituyente en C2, aunque algunos híbridos si lo tienen. De este modo, la citotoxicidad de FM113 no se debe al metilcarboxilato o a la ausencia de un sustituyente en C2. Por otro lado, el compuesto FM113 tiene el sustituyente propiloil en el nitrógeno (posición 3), mientras los híbridos en la misma posición tienen un metil o un carboxi que los une al anillo de isoxazol o de 1,2,3-triazol. Por lo tanto, la citotoxicidad presentada por FM113 posiblemente se debe a la presencia del sustituyente propiloil y la ausencia de las estructuras de isoxazol y 1,2,3-triazol.

Tabla 1.*Valores de CI_{50} (μM) con MTT para los ensayos a 48 horas de tratamiento.*

COMPUESTO	A549	Hep G2	B16F10	MCF-7	HeLa	Vero
FM102	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM78	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM115	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM113	>100	>100	40,03±3,8	>100	50,06±0,03	>100
FM66	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM97	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM127	>100	>100	>100	>100	>100	>100
FM141	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CB41	>100	71,70±0,4	23,33±2,4	>100	10,21±0,9	41,8±9,9
Oxaliplatino		22,4±1,1	4,9±1,2		14,3±2,8	51,5±2,2

Teniendo en cuenta la necesidad de que el fármaco sea citotóxico y específico para células cancerígenas, se determinó el índice de selectividad (IS), calculado como la relación del CI_{50} en las células normales/ CI_{50} en las células cancerígenas (Shi et al., 2014). De los nueve compuestos evaluados, el FM113 presenta efecto citotóxico sobre las líneas celulares cancerígenas B16F10 (CI_{50} : 40,03±3,82 μM ; IS: 2,50) y HeLa (CI_{50} : 50,06±0,03 μM ; IS: 2), aunque exhibe menor citotoxicidad y es menos selectivo en comparación con el oxaliplatino (B16F10 (CI_{50} : 4,9±1,2 μM ; IS: 10,51), HeLa (CI_{50} : 14,3±2,8 μM ; IS: 3,60)). Mientras que el compuesto 1-(6-metil-1-((3-trimetoxifenil-4,5-dihidroisoxazol-5-il)metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-4-il)pirrolidin-2-ona (CB41) presenta efecto citotóxico en las líneas celulares cancerígenas Hep G2 (CI_{50} : 71,70±0,4 μM ; IS: 0,58), B16F10 (CI_{50} : 23,33±2,43 μM ;

IS: 1,79) y HeLa (CI_{50} : $10,21 \pm 0,92 \mu\text{M}$; IS: 4,09), siendo de este modo más citotóxico y selectivo solo en las células HeLa en comparación con el oxaliplatino (Hep G2 (CI_{50} : $22,4 \pm 1,1 \mu\text{M}$; IS: 2,30); B16F10 (CI_{50} : $4,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$; IS: 10,51); HeLa (CI_{50} : $14,3 \pm 2,8 \mu\text{M}$; IS: 3,60)), pese a que presentó citotoxicidad en la línea no cancerígena Vero.

Debido a la baja citotoxicidad de los híbridos derivados de tiazolidina, se decidió evaluar el efecto sobre la proliferación celular y el mecanismo de acción del híbrido CB41 en las células de cáncer de cérvix HeLa, en las que mostró mayor efecto, postulándolo como el compuesto más prometedor de este estudio. CB41 pertenece a una familia de híbridos THQ/isoxazolina, cuya actividad citotóxica se está evaluando simultáneamente en el grupo de investigación, en la tesis doctoral titulada "evaluación de la actividad anticancerígena de nuevos híbridos moleculares tetrahidroquinolina/isoxazolina y derivados indeno [2, ic] quinolónicos".

4.1.2 Efecto del híbrido CB41 sobre la proliferación celular. El ensayo de tinción con cristal violeta (CV) permite cuantificar espectrofotométricamente la población celular viable después del tratamiento con el compuesto CB41. El CV se une a las proteínas y al ADN de las células, pero cuando dichas células crecen adheridas y están en proceso de muerte, se desprenden de las cajas de cultivo, de esta forma, solo se cuantifican las células viables que permanecen adheridas (Feoktistova, Geserick & Leverkus, 2016). Así, para determinar el efecto de CB41 en la proliferación celular, se realizaron experimentos a distintos tiempos (12-72 h) y con diferentes concentraciones, menores a la CI_{50} (1-10 μM), como se muestra en las figuras 22-25.

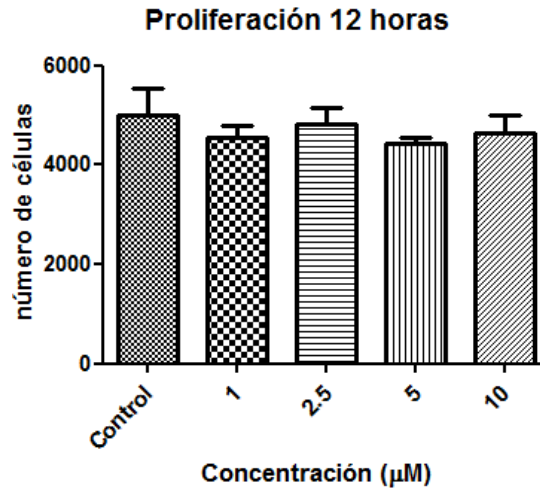


Figura 22. Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 12 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 µM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células viables. *P<0,05 frente al control.

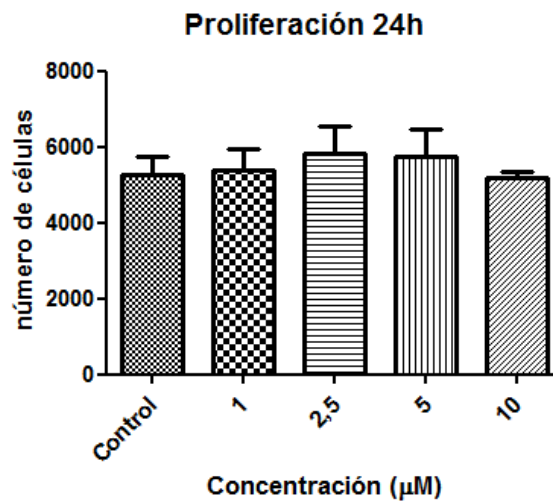


Figura 23. Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 24 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 µM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células viables. *P<0,05 frente al control.

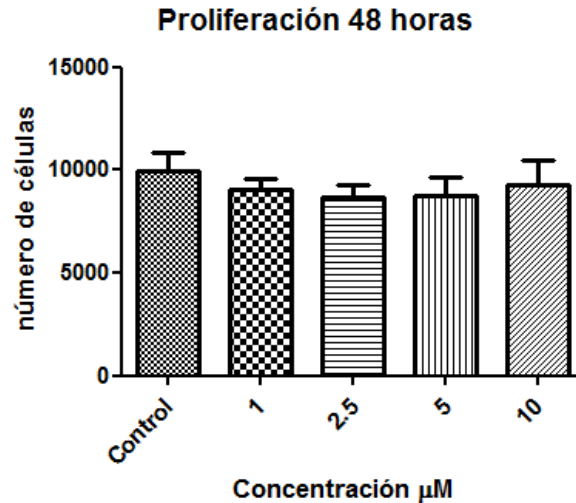


Figura 24. Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 48 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 μM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células viables. * $P < 0,05$ frente al control.

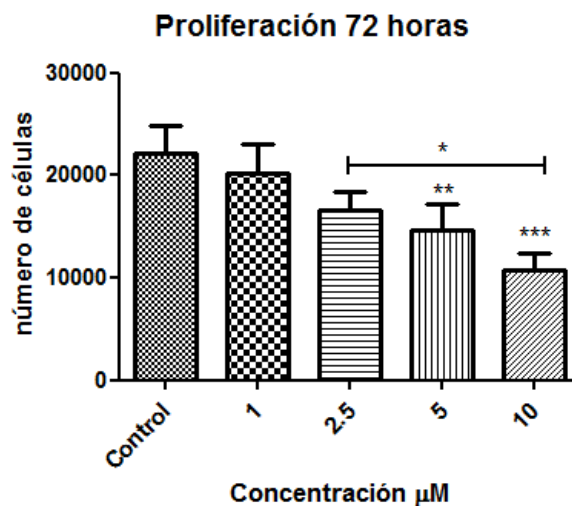


Figura 25. Efecto del compuesto CB41 sobre la proliferación de células HeLa. Las células fueron tratadas por 72 horas con diferentes concentraciones del compuesto (1-10 μM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar del número de células. * $P < 0,05$ frente al control, ** $P < 0,01$ frente al control y *** $P < 0,001$ frente al control.

El compuesto CB41 no presentó efecto alguno en la proliferación celular a 12, 24 y 48 horas de tratamiento, pero si inhibió la proliferación a 72 horas de tratamiento en las concentraciones de 2,5-10 μM , mostrando un efecto dosis dependiente. De esta forma, se nota una clara diferencia en la determinación de la viabilidad celular por CV y MTT, ya que a 48 horas de tratamiento se determinó una CI_{50} de $10,21 \pm 0,92 \mu\text{M}$ con el ensayo del MTT, mientras que al mismo tiempo de tratamiento y en una concentración de 10 μM no se halló una inhibición en la proliferación usando el método de CV. La diferencia en estos ensayos puede atribuirse a la dependencia enzimática para la degradación del MTT, mientras que el ensayo con CV no es enzimático. De esta manera, un compuesto puede inhibir deshidrogenasas o aumentar su actividad, generando falsos positivos o falsos negativos en el ensayo del MTT. Por lo tanto, puede inferirse que CB41 inhibe deshidrogenasas, lo que genera resultados falsos en la determinación de la viabilidad con este método de reducción (Śliwka et al., 2016; Van Tonder, Joubert & Cromarty, 2015).

4.2 Determinación del mecanismo de muerte celular causado por CB41

Los siguientes resultados se analizaron para lograr determinar el mecanismo de muerte celular causado en las células HeLa por el compuesto CB41. Se analizaron los cambios en la morfología celular, la liberación de citocromo c, la translocación de fosfatidilserina y el daño del potencial de membrana mitocondrial.

4.2.1 Efecto del híbrido CB41 sobre la morfología celular. Al realizar una tinción de las células con una solución de hematoxilina y eosina (GIEMSA), se pueden observar cambios morfológicos característicos de algún tipo de muerte celular con ayuda de un microscopio óptico (Salazar, 2009). En donde la hematoxilina se une a los ácidos nucleicos tiñéndolos de color azul-violeta, mientras la eosina es de color rosa y se une a proteínas de una forma no específica, especialmente a proteínas de membrana y proteínas del citoplasma. En las células

adherentes que están en proceso de muerte, es posible observar la condensación de la cromatina (tinción de hematoxilina) y tinción de núcleos con eosina (Fischer, Jacobson, Rose & Zeller, 2008).

De esta forma, en la muerte por apoptosis se pueden identificar cambios morfológicos característicos de las últimas etapas, como contracción de la célula, condensación de cromatina, formación de ampollas en la membrana, y aparición de cuerpos apoptóticos (Nikoletopoulou et al., 2013). De igual manera, es posible observar alteraciones morfológicas de la necrosis, como aumento del volumen celular, deformación y pérdida de la integridad de la membrana, generando la fuga del contenido celular (Chen, X. et al., 2014).

En la figura 26 se observa que a 24 y 48 horas de tratamiento las células presentan mayor tinción del citoplasma y las organelas, pero no es posible identificar la condensación de cromatina y los demás cambios significativos en la morfología, que permitan deducir que mecanismo de muerte están experimentando las células HeLa tratadas con el compuesto CB41.

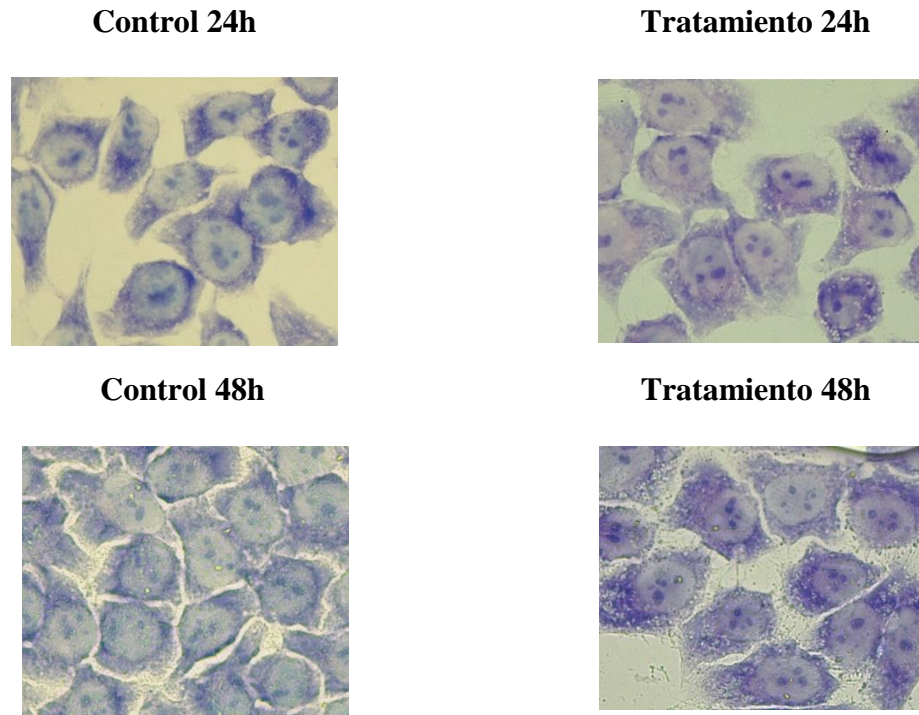


Figura 26. Morfología de células HeLa sin tratamiento (control) y con tratamiento (10 μM) a 24 y 48 horas. Las células fueron recolectadas después del tratamiento y se tiñeron con GIEMSA, posteriormente se capturaron las imágenes con ayuda de un microscopio óptico.

4.2.2 Efecto del compuesto CB41 sobre la liberación de citocromo c. La liberación de citocromo c al citosol evidencia la ejecución de la muerte celular apoptótica en las células. El citocromo c en el citosol se une a Apaf-1 e inicia la formación del apoptosoma, que genera la activación en cascada de una serie de caspasas que conducen a la muerte celular (Galluzzi et al., 2012). De esta manera, después de 24 horas de tratamiento (10 μM) se permea la membrana celular para permitir la salida del Citocromo c del citoplasma y poderlo cuantificar por espectrofotometría uv, donde se empleó como coeficiente de extinción molar del citocromo c $100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ según (Appaix et al., 2000). La camptotecina (5 μM) se usó como control positivo para este experimento. Dicho compuesto ha presentado actividad anticancerígena en

diferentes estudios *in vitro* e *in vivo*, causando muerte apoptótica en diferentes líneas celulares a través de la vía mitocondrial (Zeng et al., 2012; Liu et al., 2015). En la figura 27 Se reportan los nanomoles (nmol) de citocromo c liberado, respecto a los miligramos (mg) de proteína cuantificados para cada experimento.

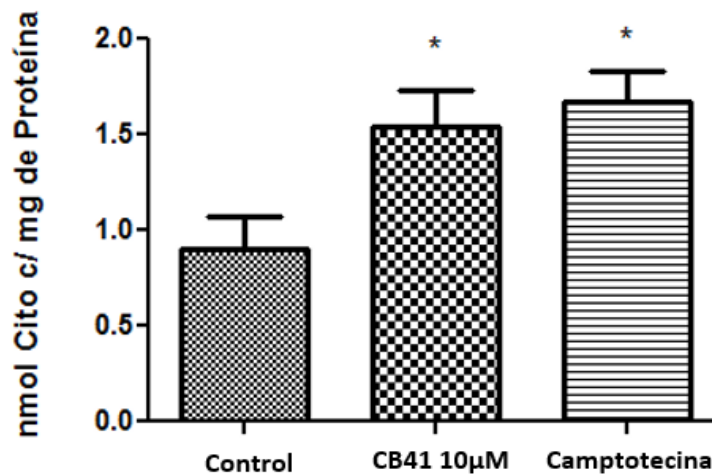


Figura 27. Liberación de citocromo c en células HeLa tratadas con CB41 y camptotecina. Las células HeLa fueron tratadas por 24 horas con el híbrido CB41 (10 µM) y la camptotecina (5 µM), excepto el control que no tiene tratamiento. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de nmol de citocromo c por mg de proteína. *P<0,05 frente al control.

En los resultados de este ensayo se observa que tanto en la población tratada como en el control se generó liberación de citocromo c al citosol. No obstante, CB41 logró liberar 1,7 veces la cantidad que se liberó en el control. Además, CB41 y la camptotecina presentaron un efecto similar. Sin embargo, la concentración de CB41 utilizada fue el doble que la de camptotecina. Por lo tanto, es posible que el híbrido cause muerte por apoptosis, sin ser posible dilucidar por cual vía. Puesto que, la vía extrínseca mediada por los receptores de muerte, puede a través de la proteína BID y la caspasa 8, generar el fragmento tBID, el cual conduce la apoptosis por la vía mitocondrial, generando también liberación de citocromo c (Czabotar et al., 2014).

Por otro lado, la muerte celular por apoptosis en la población control puede ser causada por señales de estrés extracelulares, generadas por confluencia o debido a que los nutrientes del medio empiezan a agotarse (Salazar, 2009).

4.2.3 Efecto del compuesto CB41 en la translocación de fosfatidilserina. Empleando una tinción con PE ANEXINA V/SYTOX GREEN y mediante citometría de flujo, se puede identificar la fosfatidilserina que se externaliza cuando las células experimentan apoptosis, así como el ADN que queda expuesto cuando las células mueren por necrosis o en etapas tardías de apoptosis (Scrochi et al., 2013; Periasamy, Athinarayanan, Alhazmi, Alatih & Alshatwi, 2016). La figura 28 muestra los diagramas para las células sin tratamiento (figura 28A), tratadas con camptotecina como control positivo para apoptosis (figura 28B) y tratadas con CB41 (figura 28C). El tratamiento con CB41 (10 μ M) no mostró diferencias respecto al control en el porcentaje de células marcadas con Anexina V (-)/Sytox (+) (necrosis; Q1), Anexina V (+)/Sytox (-) (apoptosis; Q4) y Anexina v (+)/Sytox (+) (apoptosis tardía; Q2). De esta manera, no se evidenciaron características de muerte celular necrótica o apoptótica causadas por CB41, a 24 horas de tratamiento y una concentración de 10 μ M. Por otro lado, con la camptotecina se generó un aumento significativo en el porcentaje de células apoptóticas (Q4), en comparación con el control y el tratamiento con CB41.

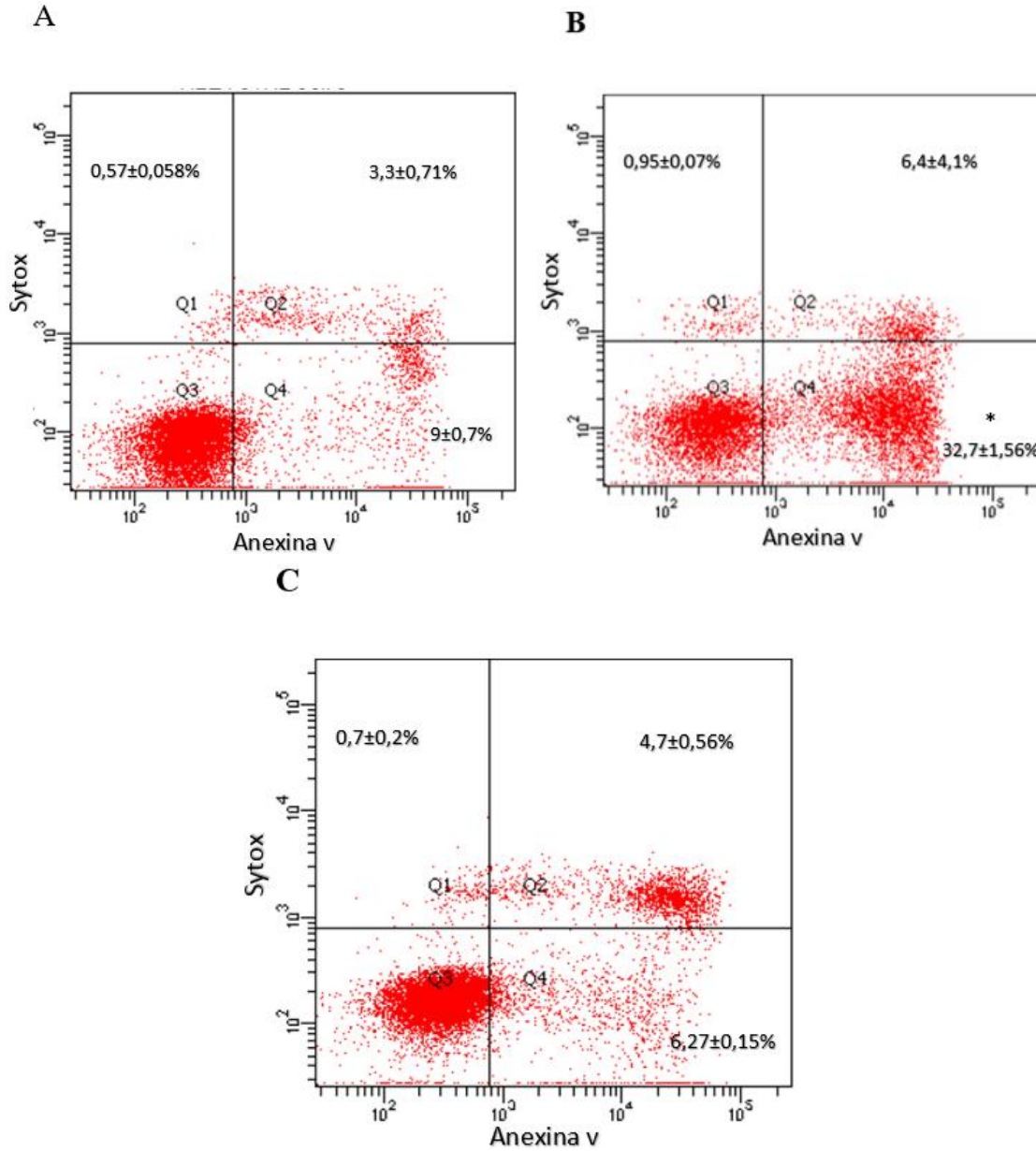


Figura 28. Tinción con anexina V-Sytox de células HeLa tratadas con el compuesto CB41 y camptotecina. Las células HeLa fueron tratadas por 24 horas con el híbrido CB41 (10 μ M) y la camptotecina (5 μ M), excepto el control que no tiene tratamiento. Luego, las células se soltaron con tripsina y se analizaron mediante citometría de flujo. A) Control, B) Camptotecina 5 μ M, C) CB41 10 μ M. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar de dos experimentos independientes. *P<0,05 frente al control.

4.2.4 Efecto del híbrido CB41 sobre el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$). El descenso del potencial de membrana mitocondrial hace parte de los eventos que caracterizan la apoptosis, y se da en las primeras etapas (Rosal, Useche, Morán, López & Bruges, 2018). Para medir el potencial de membrana las células fueron recolectadas después del tratamiento y se utilizó el catión lipofílico fluorescente Rodamina123 (Rho-123), el cual se incorpora en la mitocondria en función del estado energético de la misma (Salazar, 2009). Se usó camptotecina como control positivo del experimento, debido a que este fármaco genera muerte apoptótica en células, produciendo liberación de citocromo c y disminución del potencial de membrana mitocondrial (Sanchez-Alcazar, Ault, Khodjakov & Schneider, 2000).

La figura 29 muestra la intensidad de fluorescencia para las células control, las tratadas con CB41 (10 μ M) y las tratadas con camptotecina (5 μ M). Donde la fluorescencia es directamente proporcional al potencial de membrana mitocondrial. El compuesto CB41 disminuyó significativamente el potencial respecto al control, presentando un efecto similar al de la camptotecina. De esta manera, se evidencia que, a 24 horas de tratamiento CB41 disminuyó el potencial de membrana mitocondrial, permitiendo la liberación de citocromo c, lo que indica, que posiblemente hay células experimentando etapas tempranas de la muerte por apoptosis mediada por la mitocondria. Donde las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 responsables de inhibir la permeabilidad mitocondrial, se expresan poco, mientras las proteínas proapoptóticas como Bax, encargadas de conducir a la muerte celular a través de la reducción del potencial de membrana mitocondrial, están altamente expresadas (Chiu & Su, 2010; Zhao, Huo, Sun & Dong, 2015).

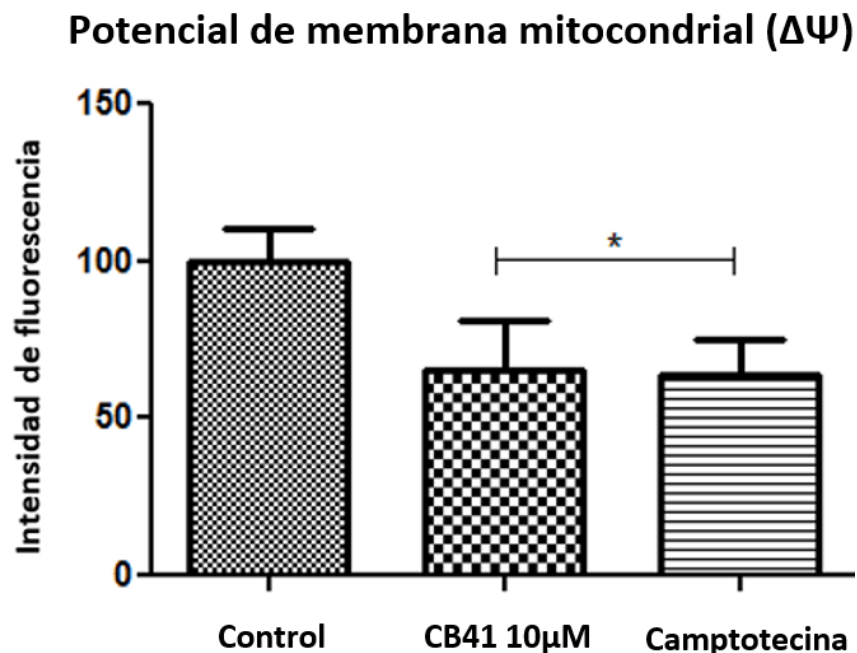


Figura 29. Efecto del compuesto CB41 sobre el potencial de membrana mitocondrial. Los resultados fueron determinados por citometría de flujo después de 24h de tratamiento y se expresan como la media \pm desviación estándar de los experimentos independientes. La camptotecina (5 μ M) fue utilizada como control positivo. * $P < 0,05$ frente al control.

El análisis de los resultados obtenidos del efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular, indican que los híbridos derivados de tiazolidina no presentan efecto citotóxico en las líneas celulares estudiadas. No obstante, el compuesto derivado de tiazolidina FM113 exhibió citotoxicidad en dos líneas celulares. Por otra parte, el compuesto híbrido de THQ/isoxazolina CB41, presentó citotoxicidad en 3 líneas celulares, donde el efecto más potente fue sobre las células HeLa, siendo más citotóxico y selectivo que el fármaco oxaliplatino.

Los resultados obtenidos para el híbrido CB41 en los ensayos de proliferación celular y determinación del mecanismo de muerte celular, mostraron que dicho híbrido inhibe la proliferación celular de una forma dosis dependiente a 72 horas de tratamiento, presentando

diferencias estadísticamente significativas a partir de la concentración de 2,5 μM . Además, generó liberación de citocromo c al citosol y disminución del potencial de membrana mitocondrial a 24 horas de tratamiento y una concentración de 10 μM , exhibiendo un efecto similar al de la camptotecina. Sin embargo, CB41 no causó translocación de la fosfatidilserina a la parte externa de la membrana plasmática a las mismas 24 horas de tratamiento y una concentración de 10 μM . Además, en el ensayo de morfología celular no se detectaron cambios característicos de la muerte apoptótica.

Con estos resultados se deduce que el compuesto CB41 genera muerte celular, con liberación de citocromo c al citoplasma y daño de potencial de membrana mitocondrial. Por otro lado, no se detectaron cambios morfológicos característicos de la apoptosis, ni externalización de la fosfatidilserina, que ocurre como señal para la fagocitosis, ya que estos eventos hacen parte de la secuencia final de cambios en la apoptosis, mientras la liberación de citocromo c y la disminución del potencial de membrana mitocondrial ocurren al inicio de la apoptosis (Nonaka, Shiratsuchi, Nagaosa & Nakanishi., 2017).

De esta manera, este estudio en general es un aporte al conocimiento de la actividad anticancerígena de estos nuevos híbridos, y al mecanismo de acción de CB41 en células HeLa. Sin embargo, para establecer por completo dicho mecanismo, se necesitan ensayos que permitan identificar caspasas y genes activos durante la muerte celular, además de analizar la morfología celular por microscopía electrónica, para lograr observar detalladamente la condensación de la cromatina y los cambios a nivel de citoplasma y membrana plasmática.

Como resultado de la citotoxicidad, la selectividad e inhibición de la proliferación celular exhibida por el compuesto CB41 en estos ensayos, se podría postular para el estudio de su

actividad anticancerígena *in vivo*, y de esta forma, determinar si es un compuesto prometedor, que pueda establecerse como un fármaco para el tratamiento de pacientes con cáncer de cérvix.

5. CONCLUSIONES

- El derivado de tiazolidina FM113 presentó citotoxicidad moderada en células HeLa y B16F10. No obstante, los híbridos derivados de tiazolidina no mostraron citotoxicidad.
- El compuesto híbrido de THQ/isoxazolina (CB41) mostró actividad citotóxica moderada en la línea celular de adenocarcinoma de hígado (Hep G2), y actividad citotóxica alta en las líneas celulares de adenocarcinoma de cérvix (HeLa) y melanoma (B16F10), siendo más potente y selectivo sobre las células HeLa en comparación con el oxaliplatino.
- El compuesto CB41 inhibió la proliferación de células HeLa a partir de concentraciones de 2,5 μM a 72 horas de tratamiento, exhibiendo un efecto dosis dependiente.
- El compuesto CB41 no causó cambios significativos en la morfología celular, que permitieran determinar el mecanismo de muerte que estaban experimentando las células.
- El compuesto CB41 no mostró translocación de la fosfatidilserina a la parte externa de la membrana celular.
- El compuesto CB41 generó liberación de citocromo c y disminución del potencial de membrana mitocondrial en las células HeLa, evidenciando una muerte por apoptosis mediada por la mitocondria.

6. Recomendaciones

- ✓ Realizar ensayos que permitan identificar caspasas y genes activos en la apoptosis. Además, estudiar los cambios morfológicos con ayuda de un microscopio electrónico de transmisión.

- ✓ Al evaluar el mecanismo de muerte celular utilizando PE ANEXINA V/SYTOX GREEN por Citometría de flujo, probar concentraciones mayores a 10 μ M y que no disminuyan la población de células en un porcentaje mayor a 20%.

- ✓ Realizar ensayos para evaluar si la muerte celular se da por medio de otros mecanismos como la autofagia.

7. Divulgación de Resultados

Los resultados de este proyecto fueron divulgados en el I Encuentro Internacional en Ciencias de la Salud: el saber y la tecnología al servicio de la vida, realizado en la ciudad de Bucaramanga, del 13 al 16 de junio de 2017, y en el III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2, realizado en la ciudad de Bogotá, del 1 al 3 de noviembre de 2017 (ver apéndices).

Referencias Bibliográficas

- Agalave, S. G., Maujan, S. R., & Pore, V. S. (2011). Click Chemistry: 1,2,3-triazole as pharmacophore. *Chemistry—An Asian Journal*, 6(10), 2696–2718. doi: 10.1002/asia.201100432
- Ajay Kumar, K., & Jayaroopa, P. (2013). Isoxazoles: molecules with potential medicinal properties. International Journal of Pharmaceutical. *Chemical and Biological Sciences*, 3(2, cop), 294-304. Recuperado de <http://eprints.uni-mysore.ac.in/13188/>
- Anand, P., Kunnumakara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S.... Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097-2116. doi: 10.1007/s11095-008-9690-4
- Appaix, F., Minatchy, M. N., Riva-Lavieille, C., Olivares, J., Antonsson, B., & Saks, V. (2000). Rapid spectrophotometric method for quantiation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1457(3), 175-181. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00098-0
- Arango, D., Wilson, A. J., Shi, Q., Corner, G. A., Aranes, M. J., Nicholas, C.... Augenlicht, L. H. (2004). Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *British journal of cancer*, 91(11), 1931-1946. doi: 10.1038/sj.bjc.6602215
- Armstrong, C. A., & Tomita, K. (2017). Fundamental mechanisms of telomerase action in yeasts and mammals: understanding telomeres and telomerase in cancer cells. *Open biology*, 7(3), 160338. doi: 10.1098/rsob.160338
- Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., & Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(4), 273-284. doi: 10.1038/nrd.2016.253
- Beharry, Z., Zemskova, M., Mahajan, S., Zhang F., Ma, J., Xia, Z.... Kraft, A. S. (2009). Novel benzylidene-thiazolidine-2,4-diones inhibit Pim protein kinase activity and induce cell cycle arrest in leukemia and prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 8(6), 1473-1483. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-1037
- Bonavita, E., Pelly, V. S., & Zelenay, S. (2018). Resolving the dark side of therapy-driven cancer cell death. *Journal of Experimental Medicine*, 215(9), 1-3. doi: 10.1084/jem.20172044
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Brasaemle, D. L., & Attie, A. D. (1988). Microelisa reader quantitation of fixed, stained, solubilized cells in microtitre dishes. *Biotechniques*, 6(5), 418-419. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2483658>
- Bratsos, I., Urankar, D., Zangrando, E., Genova-Kalou, P., Komšrlj, J., Alessio, E., & Turel, I. (2011). 1-(2-Picolyl)-substituted 1,2,3-triazole as novel chelating ligand for the preparation of ruthenium complexes with potential anticancer activity. *Dalton Transactions*, 40(19), 5188–5199. doi: 10.1039/C0DT01807D
- Bretones, G., Delgado, M. D., & León, J. (2015). Myc and cell cycle control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(5), 506-516. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013
- Castillo, J. C., Jiménez, E., Portilla, J., Insuasty, B., Quiroga, J., Moreno-Fuquen, R.... Abonia, R. (2018). Application of a catalyst-free Domino Mannich/Friedel-Crafts alkylation reaction for the synthesis of novel tetrahydroquinolines of potential antitumor activity. *Tetrahedron*, 74(9), 932-947. doi: 10.1016/j.tet.2017.12.049
- Chaitanya, M. V. S. K., Reddy, P. V., Kumar, N., Kumar, A., Shah, K., & Kumar, D. (2018). Synthesis and anticancer activity studies of indolylisoxazoline analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.07.035
- Chen, D., Shen, A., Li, J., Shi, F., Chen, W., Ren, J.... & Shen, J. (2014). Discovery of potent N-(isoxazol-5-yl) amides as HSP90 inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 87(1), 765-781. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.09.065
- Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W. T., Song, Y.... & Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell research*, 24(1), 105-121. doi: 10.1038/cr.2013.171
- Chiu, T. L., & Su, C. C. (2010). Tanshinone IIA induces apoptosis in human lung cancer A549 cells through the induction of reactive oxygen species and decreasing the mitochondrial membrane potential. *International journal of molecular medicine*, 25(2), 231-236. doi: 10.3892/ijmm_00000335
- Cruz, M. D. C. L., Mendiola, A. V., & Soto Cruz, I. (2014). Ciclo celular: Mecanismos de regulación. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 17(2), 98-107. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=58779>
- Cury-Boaventura, M. F., Pompéia, C., & Curi, R. (2005). Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Raji cells. *Nutrition*, 21(3), 395–405. doi: 10.1016/j.nut.2004.07.007
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasse, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(1), 49-63. doi: 10.1038/nrm3722

- DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L.... Jemal, A. (2014). Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(4), 252–271. doi: 10.3322/caac.21235
- Dheer, D., Singh, V., & Shankar, R. (2017). Medicinal attributes of 1, 2, 3-triazoles: Current developments. *Bioorganic chemistry*, 71, 30-54. doi: 10.1016/j.bioorg.2017.01.010
- Duan, Y. C., Ma, Y. C., Zhang, E., Shi, X. J., Wang, M. M., Ye, X. W., & Liu, H. M. (2013). Design and synthesis of novel 1, 2, 3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62(1), 11-19. doi: 10.1016/j.ejmech.2012.12.046
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337
- Escobar M, L., & Aristizábal G, F. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173-180. Recuperado de <http://www.redalyc.org/html/1698/169815396009/>
- Espinosa, M. B. (2014). Apoptosis, muerte celular fisiológica, reseña histórica y actualidad. *Revista de Educación en Biología*, 17(1), pp-153. Recuperado de <http://www.revistaadbia.com.ar/ojs/index.php/adbia/article/view/238/pdf>
- Faidallah, H. M., Saqer, A. A., Alamry, K. A., Khan, K. A., & Asiri, A. M. (2014). Synthesis and biological evaluation of some novel tetrahydroquinolines as anticancer and antimicrobial agents. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 29(3), 367-378. doi: 10.3109/14756366.2013.787421
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343-346. doi: 10.1101/pdb.prot087379
- Fernández-Medarde, A., & Santos, E. (2011). Ras in cancer and developmental diseases. *Genes & cancer*, 2(3), 344-358. doi: 10.1177/1947601911411084
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(5), 1-2. doi: 10.1101/pdb.prot4986
- Galanos, P., Vougas, K., Walter, D., Polyzos, A., Maya-Mendoza, A., Haagensen, E. J.... Gorgoulis, G. (2016). Chronic p53-independent p21 expression causes genomic instability by deregulating replication licensing. *Nature cell biology*, 18(7), 777-789. doi: 10.1038/ncb3378
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P.... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature

- Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 1, 486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4
- Galluzzi, L., Vitale, I.; Abrams, J. M.; Alnemri, E. S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M. V.... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120. doi: 10.1038/cdd.2011.96
- Gedawy, E. M., Kassab, A. E., & El-Malah, A. A. (2015). Synthesis and anticancer activity of novel tetrahydroquinoline and tetrahydropyrimidoquinoline derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 24(9), 3387-3397. doi: 10.1007/s00044-015-1388-7
- Giansanti, V., Torriglia, A., & Scovassi, A. I. (2011). Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". *Apoptosis*, 16(4), 321-333. doi: 10.1007/s10495-011-0589-x
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences*, 32(1), 37-43. doi: 10.1016/j.tibs.2006.11.001
- Harashima, H., Dissmeyer, N., & Schnittger, A. (2013). Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends in cell biology*, 23(7), 345-356. doi: 10.1016/j.tcb.2013.03.002
- Havrylyuk, D., Kovach, N., Zimenkovsky, B., Vasylenko, O. & Lesyk, R. (2011). Synthesis and Anticancer Activity of Isatin-Based Pyrazolines and Thiazolidines Conjugates. *Archiv der Pharmazie*, 344(8), 514-522. doi: 10.1002/ardp.201100055
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714-726. doi: 10.1038/nrc3599
- Hu, L., Zhang, H., Bergholz, J., Sun, S., & Xiao, Z. X. J. (2016). MDM2/MDMX: Master negative regulators for p53 and RB. *Molecular & cellular oncology*, 3(2), e1106635. doi: 10.1080/23723556.2015.1106635
- Johansen, T., & Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, 7(3), 279-296. doi: 10.4161/auto.7.3.14487
- Karimian, A., ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA repair*, 42, 63-71. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.04.008
- Kaur, K., Kumar, V., Sharma, A. K., & Gupta, G. K. (2014). Isoxazoline containing natural products as anticancer agents: a review. *European journal of medicinal chemistry*, 77, 121-133. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.02.063

- Kumar, R. N., Dev, G. J., Ravikumar, N., Swaroop, D. K., Debanjan, B., Bharath, G.... Rao, A. G. (2016). Synthesis of novel triazole/isoxazole functionalized 7-(trifluoromethyl) pyrido [2, 3-d] pyrimidine derivatives as promising anticancer and antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 26(12), 2927-2930. doi: 10.1016/j.bmcl.2016.04.038
- Lavanya, G., Reddy, L. M., Padmavathi, V., & Padmaja, A. (2014). Synthesis and antimicrobial activity of (1,4-phenylene)bis(arylsulfonylpyrazoles and isoxazoles). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 73(1), 187-194. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.11.041
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R.... Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505(7484), 495-503. doi: 10.1038/nature12912
- Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao.... Gu, W. (2012). Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*, 149(6), 1269-1283. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.026
- Liu, Y. Q., Li, W. Q., Morris-Natschke, S. L., Qian, K., Yang, L., Zhu, G. X.... Lee, K. H. (2015). Perspectives on biologically active camptothecin derivatives. *Medicinal research reviews*, 35(4), 753-789. doi: 10.1002/med.21342
- López, J. M., Ensuncho, A. E., & Robles, J. (2013). Estudio Teórico de la Reactividad Química y Biológica de Cisplatino y algunos Derivados con Actividad Anticancerosa. *Información tecnológica*, 24(3), 3-14. doi: 10.4067/S0718-07642013000300002
- Lu, Z., & Hunter, T. (2010). Ubiquitylation and proteasomal degradation of the p21^{Cip1}, p27^{Kip1} and P57^{Kip2} CDK inhibitors. *Cell cycle*, 9(12), 2342-2352. doi: 10.4161/cc.9.12.11988
- Ma, L. Y., Wang, B., Pang, L. P., Zhang, M., Wang, S. Q., Zheng, Y. C.... Liu, H. M. (2015). Design and synthesis of novel 1, 2, 3-triazole-pyrimidine-urea hybrids as potential anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(5), 1124-1128. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.12.087
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(2), 81-94. doi: 10.1038/nrm3735
- Miller, D. M., Thomas, S. D., Islam, A., Muench, D., & Sedoris, K. (2012). c-Myc and cancer metabolism. *Clinical Cancer Research*. 18(20), 5546-5553. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0977
- Min, K. H., Park, K., Kim, Y. S., Bae, S. M., Lee, S., Jo, H. G.... Kwon, I. C. (2008). Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 127(3), 208-218. doi: 10.1016/j.jconrel.2008.01.013

- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., & Bhutia, S. K. 2014. Autophagy and apoptosis: Where do they meet? *Apoptosis*, 19(4), 555-566. doi: 10.1007/s10495-014-0967-2
- Muller, P. A., & Vousden, K. H. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell*, 25(3), 304-317. doi: 10.1016/j.ccr.2014.01.021
- Nagaiah, K., Venkatesham, A., Rao, R. S., Saddanapu, V., Yadav, J. S., Basha, S. J.... Addlagatta, A. (2010). Synthesis of new cis-fused tetrahydrochromeno [4, 3-b] quinolines and their antiproliferative activity studies against MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(11), 3259-3264. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.04.061
- Nepali, K., Sharma, S., Sharma, M., Bedi, P. M. S., & Dhar, K. L. (2014). Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *European journal of medicinal chemistry*, 77, 422-487. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.03.018
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001
- Nonaka, S., Shiratsuchi, A., Nagaosa, K., & Nakanishi, Y. (2017). Mechanisms and Significance of Phagocytic Elimination of Cells Undergoing Apoptotic Death. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(11), 1819-1827. doi: 10.1248/bpb.b17-00478
- Onen-Bayram, F. E., Buram, K., Durmaz, I., Berk, B., & Cetin-Atalay, R. (2015). 3-Propionyl-thiazolidine-4-carboxylic acid ethyl esters: a family of antiproliferative thiazolidines. *Medicinal Chemistry Communications*, 6(1), 90-93. doi: 10.1039/C4MD00306C
- Onen-Bayram, F. E., Durmaz, I., Scherman, D., Herscovici, J., & Cetin-Atalay, R. (2012). A novel thiazolidine compound induces caspase-9 dependent apoptosis in cancer cells. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(17), 5094-5102. doi: 10.1016/j.bmc.2012.07.016
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115. doi: 10.1038/nrc.2016.138
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell proliferation*, 45(6), 487-498. doi: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x

- Pandey, Y., Sharma, P. K., Kumar, N., & Singh, A. (2011). Biological Activities of Thiazolidine- a review. *International Journal PharmTech Research*, 3(2), 980-985. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/83c5/b10966ac790660d1ab0374510dabefc7e6e5.pdf>
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460-473. doi: 10.1089/ars.2013.5371
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 311-320. doi: 10.1038/nature14191
- Pedada, S. R., Yarla, NS., Tambade, PJ., Dhananjada, BL., Bishayee, A., Arunasree, KM.... Rangaiah, G. (2016). Synthesis of new secretory phospholipase A2-inhibitory indole containing isoxazole derivatives as anti-inflammatory and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 112(1), 289-297. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.025
- Peña-Sanoja, M. J., y De sanctis, J. B. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigación Clínica*, 54(3), 325-337. Recuperado de <http://clinicajournal.com/index.php/path/article/download/479/482>
- Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., Alhazmi, M., Alatah, K. A., & Alshatwi, A. A. (2016). Fe₃O₄ nanoparticle redox system modulation via cell-cycle progression and gene expression in human mesenchymal stem cells. *Environmental toxicology*, 31(8), 901-912. doi: 10.1002/tox.22098
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619. doi: 10.18632/aging.100934
- Prajapti, S. K., Shrivastava, S., Bihade, U., Gupta, A. K., Naidu, V. G. M., Banerjee, U. C., & Babu, B. N. (2015). Synthesis and biological evaluation of novel Δ^2 -isoxazoline fused cyclopentane derivatives as potential antimicrobial and anticancer agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 6(5), 839-845. doi: 10.1039/C4MD00525B
- Purvis, J. E., Shih, A. J., Liu, Y., & Radhakrishnan, R. (2011). Cancer Cell: Linking Oncogenic Signaling to Molecular Structure. *Chapman & Hall/CRC Mathematical & Computational Biology Series*, 2011, 31-44. Recuperado de <https://www.taylorfrancis.com/books/e/9781439814420/chapters/10.1201%2Fb10407-7>
- Raymond, E., Chaney, S. G., Taamma, A., & Cvitkovic, E. (1998). Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*, 9(10), 1053-1071. doi: 10.1023/A:1008213732429
- Ramírez Agudelo, M. E., y Rojas López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Iatreia*, 23(2), 166-177. Recuperado de <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/iatreia/article/view/11130>

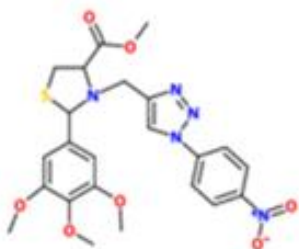
- Rasool, F., Nayak, D., Katoch, A., Faheem, M. M., Yousuf, S. K., Hussain, N.... Mukherjee, D. (2017). Regiospecific synthesis of ring a fused withaferin a isoxazoline analogues: induction of premature senescence by W-2b in proliferating cancer cells. *Scientific reports*, 7(13749), 1-18. doi: 10.1038/s41598-017-13664-x
- Rathore, R., McCallum, J. E., Varghese, E., Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2017). Overcoming chemotherapy drug resistance by targeting inhibitors of apoptosis proteins (IAPs). *Apoptosis*, 22(7), 898-919. doi: 10.1007/s10495-017-1375-1
- Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Salvador, M. K., Camacho, M. E., Balzarini, J., Bermejo, J., & Estévez, F. (2013). Anticancer activity of novel hybrid molecules containing 5-benzylidene thiazolidine-2,4-dione. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 63(1), 544-557. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.02.030
- Rosal, K., Useche, A., Morán, L., López, M., & Bruges, G. (2018). La epigalocatequina-3-galato induce apoptosis en plaquetas. *Investigación Clínica*, 59(2), 146-154. doi: 10.22209/IC.v59n2a04
- Sadashiva, M. P., NanjundaSwamy, S., Li, F., Manu, K. A., Sengottuvelan, M., Prasanna, D. S.... Rangappa, K. S. (2012). Anti-cancer activity of novel dibenzo [b, f] azepine tethered isoxazoline derivatives. *BMC chemical biology*, 12(5), 1-11. doi: 10.1186/1472-6769-12-5
- Salazar, M. M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista colombiana de biotecnología*, 11(2), 152-166. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3105405>
- Sanchez-Alcazar, J. A., Ault, J. G., Khodjakov, A., & Schneider, E. (2000). Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells. *Cell death and differentiation*, 7(11), 1090. doi: 10.1038/sj.cdd.4400740
- Sánchez-Cano, C., & Hannon, M. J. (2009). Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Transactions*, (48), 10702-10711. doi: 10.1039/B912708A
- Sánchez, R., y Arboleda, G. (2008). Mitocondria y muerte celular. *NOVA*, 6(10), 190-200. doi: 10.22490/24629448.409
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, 28(33), 2925-2939. doi: 10.1038/onc.2009.170
- Scrochi, M. R., Zanuzzi, C. N., Muglia, C. I., Fuentealba, N. A., Nishida, F., Gimeno, E.... Galosi, C. M. (2013). Interferencia del Herpesvirus equino 1 (EHV-1) en la apoptosis inducida. *InVet*, 15(2), 83-91. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982013000200001&script=sci_arttext&tlng=pt

- Shang, D., Wu, Y., Ding, Y., Lu, Z., Shen, Y., Zhu, F.... Tu, Z. (2018). Identification of a pyridine derivative inducing senescence in ovarian cancer cell lines via P21 activation. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 45(5), 452-460. doi: 10.1111/1440-1681.12891
- Shi, J., Alagoz, O., Erenay, F. S., & Su, Q. (2014). A survey of optimization models on cancer chemotherapy treatment planning. *Annals of Operations Research*, 221(1), 331–356. doi: 10.1007/s10479-011-0869-4
- Sindhu, J., Singh, H., Khurana, J. M., Sharma, C., & Aneja, K. R. (2015). Multicomponent domino process for the synthesis of some novel 5-(arylidene)-3-((1-aryl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-thiazolidine-2,4-diones using PEG-400 as an efficient reaction médium and their antimicrobial evaluation. *Chinese Chemical Letters*, 26(1), 50–54. doi: 10.1016/j.ccllet.2014.09.006
- Singh, P., Raj, R., Kumar, V., Mahajan, M. P., Bedi, P. M. S., Kaur, T., & Saxena, A. K. (2012). 1, 2, 3-Triazole tethered b-lactam-Chalcone bifunctional hybrids: Synthesis and anticancer evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 47(1), 594-600. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.10.033
- Śliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K.... Chilmonczyk, Z. (2016). The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PloS one*, 11(5), 1-17. doi: 10.1371/journal.pone.0155772
- Soriano, J., Mora-Espí, I., Alea-Reyes, M. E., Pérez_garcía, L., Barrios, L., Ibáñez, E., & Noguéz, C. (2017). Cell death mechanisms in tumoral and non-tumoral human cell lines triggered by photodynamic treatments: apoptosis, necrosis and parthanatos. *Scientific reports*, 7(41340), 1-13. doi: 10.1038/srep41340
- Soukasene, S., Toft, D. J., Moyer, T. J., Lu, H., Lee, H. K., Standley, S. M.... Stupp, S. I. (2011). Antitumor activity of peptide amphiphile nanofiber-encapsulated camptothecin. *ACS nano*, 5(11), 9113-9121. doi: 10.1021/nn203343z
- Sridharan, V., Suryavanshi, P. A., & Menéndez, J. C. (2011). Advances in the chemistry of tetrahydroquinolines. *Chemical reviews*, 111(11), 7157-7259. doi: 10.1021/cr100307m
- Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta histochemica*, 114(8), 785-796. doi: 10.1016/j.acthis.2012.01.006
- Sullcahuamán-Allende, Y. & Arias-Velásquez, A. (2008). Cáncer de mama y ovario hereditario. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*, 54(3), 194-198. Recuperado de <http://spog.org.pe/web/revista/index.php/RPGO/article/view/1113>
- Tatar, E., Küçükgülzel, İ., De Clercq, E., Şahin, F. & Güllüce, M. (2008). Synthesis, characterization and screening of antimicrobial, antituberculosis, antiviral and anticancer

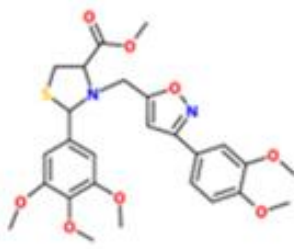
- activity of novel 1,3-thiazolidine-4-ones derived from 1-[2-(benzoylamino)-4-(methylthio)butyryl]-4-alkyl/arylalkyl thiosemicarbazides. *Arkivoc*, 14(1), 191-210. Recuperado de <http://www.arkat-usa.org/get-file/26680.html>
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8(1), 47-57. doi: 10.1186/s13104-015-1000-8
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x
- Williams, G. H., & Stoeber, K. (2012). The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*, 226(2), 352-364. doi: 10.1002/path.3022
- Yong, J., Lu, C., & Wu, X. (2014). Synthesis of isoxazole moiety containing ferrocene derivatives and preliminarily in vitro anticancer activity. *Medicinal Chemistry Communications*, 5(7), 968-972. doi: 10.1039/C4MD00151F
- Zeng, C. W., Zhang, X. J., Lin, K. Y., Ye, H., Feng, S. Y., Zhang, H., & Chen, Y. Q. (2012). Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via miR-125b mediated mitochondrial pathways. *Molecular pharmacology*, 81(4), 578-586. doi: 10.1124/mol.111.076794
- Zhang, Q., Zhou, H., Zhai, S., & Yan, B. (2010). Natural Product-Inspired Synthesis of Thiazolidine and Thiazolidinone Compounds and their Anticancer Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 16(16), 1826-1842. doi: 10.2174/138161210791208983
- Zhao, Q., Huo, X. C., Sun, F. D., & Dong, R. Q. (2015). Polyphenol-rich extract of *Salvia chinensis* exhibits anticancer activity in different cancer cell lines, and induces cell cycle arrest at the G0/G1-phase, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential in pancreatic cancer cells. *Molecular medicine reports*, 12(4), 4843-4850. doi: 10.3892/mmr.2015.4074

Apéndices

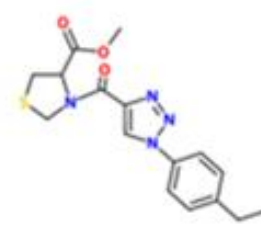
Apéndice A. Estructuras de los híbridos moleculares tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol y THQ/Isoxazolina.



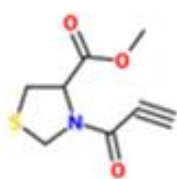
FM102



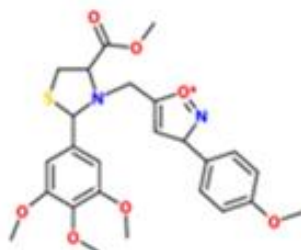
FM78



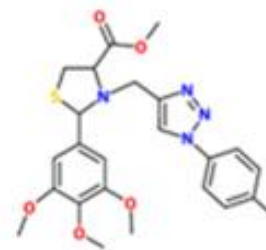
FM115



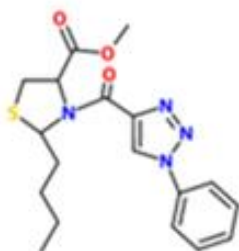
FM113



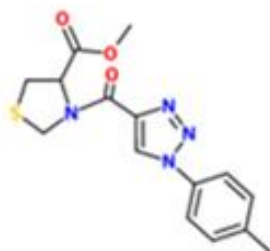
FM66



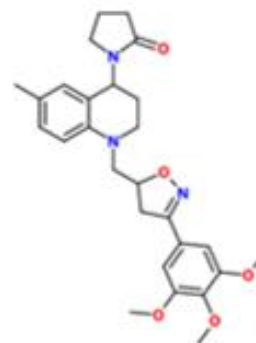
FM97



FM127



FM141

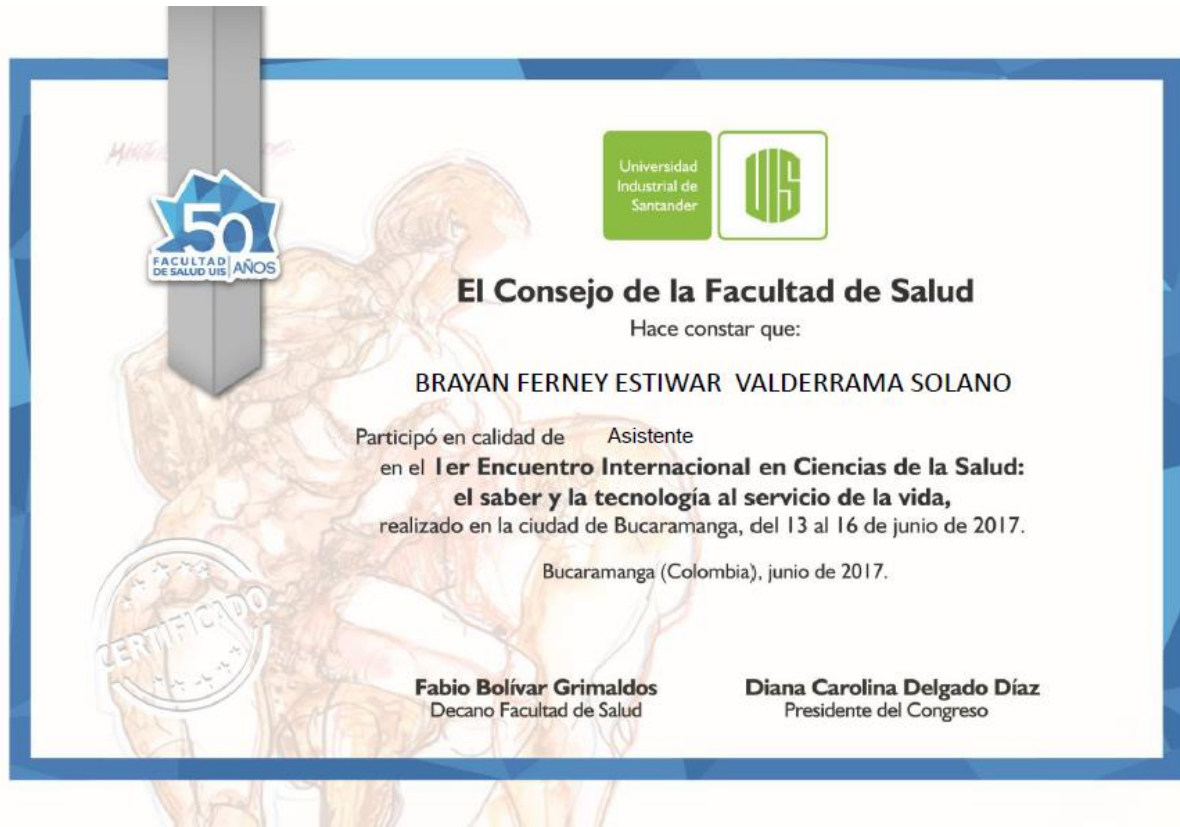


CB41

Apéndice B. Nombres IUPAC y peso molecular de los híbridos tiazolidina/1,2,3-triazol, tiazolidina/isoxazol, y THQ/Isioxazolina

Nombre IUPAC	Peso molecular (g/mol)	Código
(4R)-Metil-3-((3-(3,4-dimetoxifenil)isoxazol-5-il)metil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazolidin-4-metilcarboxilato	530,59	FM78
(4R)-Metil-3-((1-(4-nitrofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazolidin-4-carboxilato	515,42	FM102
(4R)-Metil-3-(1-(4-etilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbonil)tiazolidin-4-carboxilato	332,42	FM115
(4R)-Metil-3-propiloil-tiazolidin-4-carboxilato	201	FM113
(4R)-Metil-3-((3-(4-metoxifenil)isoxazol-5-il)metil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazolidin-4-metilcarboxilato	506	FM66
(4R)-Metil-3-((1-(4-metilfenil)isoxazol-5-il)metil)-2-(3,4,5-trimetoxifenil)tiazolidin-4-metilcarboxilato	484,5	FM97
(4R)-Metil-2-butil-3-(1-(4-fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbonil)tiazolidin-4-carboxilato	374,4	FM127
(4R)-Metil-3-(1-(4-metilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-carbonil)tiazolidin-4-carboxilato	332,3	FM141
1-(6-metil-1-((3-trimetoxifenil-4,5-dihidroisoxazol-5-il)metil)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-4-il)pirrolidin-2-ona	479,57	CB41

Apéndice C. Certificado del 1 er Encuentro Internacional en Ciencias de la Salud.



Apéndice D. Certificado del III Congreso de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2



Los organizadores del III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2

Certifican que el trabajo titulado: “Novel molecular hybrids of Tetrahydroquinoline/Isoxazoline as new possible treatments of cervical cancer and melanome.” fue presentado por Vesga L, Valderrama B, Bernal C, Romero A, Méndez S

En modalidad póster en el área temática de Salud Humana & Animal durante el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 llevado a cabo en la ciudad de Bogotá, Colombia del 1 al 3 de Noviembre de 2018.



Harold Dúban Ardila
Presidente Comité Organizador C2B2
Presidente SCCQ



Patricia del Portillo
Presidenta Comité Científico C2B2