

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Actividad biológica de una nueva serie de derivados
de hidrazonas y su potencial terapéutico en
endometriosis”

Memoria entregada a la Universidad de Chile para
optar al título profesional de Bioquímica

Tamara Ramírez Pavez

Directores de tesis: Dra. María Martínez-Esparza Alvargonzález

Dr. Antonio José Ruiz Alcaraz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología,

Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España

Profesor Patrocinante: Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Chile

Enero 2020

Financiación y presentaciones

Esta memoria fue financiada por la plataforma de micromecenazgo (*crowdfunding*) de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECyT): Precipita (Código de proyecto: PR200; Endometriosis) y por el Plan Propio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia.

Esta memoria dio origen a la participación como comunicación en las IV Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca: “Análisis del potencial antitumoral de una nueva serie de derivados de hidrazidas”.

Agradecimientos

A Pilar, María y Antonio quienes me recibieron de la mejor manera en su grupo de investigación e hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A mi familia por apoyarme y ayudarme a concretar esta aventura pese a que me llevaría muy lejos de ustedes.

A Cristian por ser mi *coach* durante los primeros meses y ayudarme a tomar el ritmo.

A JuanFran por ayudarme a hacer esos fastidiosos ELISAs.

A mi gran amiga Samira por siempre escucharme, apoyarme y hacerme reír pese a la distancia.

A mi profesora patrocinante, Daniela Seelenfreund, quien hizo que la gestión de esto fuese mucho más fácil y por siempre intentar ayudar.

Y finalmente, aunque no por eso menos importante, a Guillaume, con quién he compartido este camino y quien me ha apoyado incondicionalmente durante todo este proceso. Gracias por hacer que todo sea mejor y aguantar mi mal humor mientras escribía este trabajo.

Gracias a todos y cada uno de ustedes, ya que sin su aporte esto no habría sido posible.

Índice General

Financiación y presentaciones	I
Agradecimientos	II
Índice General.....	III
Índice de Figuras.....	V
Índice de Tablas	VI
Abreviaturas	VII
Resumen	VIII
Summary:	IX
1. Antecedentes.....	1
1.1. Hidrazidas.....	1
1.1.1. Actividad antitumoral/anticancerígena	2
1.1.2. Actividad antiinflamatoria y analgésica.....	2
1.1.3. Actividad antimicrobiana	4
1.1.4. Actividad anticonvulsivante	5
1.1.5. Otras actividades.....	6
1.2. Endometriosis	6
1.2.1. Macrófagos peritoneales en endometriosis	7
1.2.2. Importancia de las citoquinas en la endometriosis	8
2. Objetivos e hipótesis del trabajo.....	10
2.1. Hipótesis.....	10
2.2. Objetivo general	10
2.3. Objetivos específicos	10
3. Metodología.....	11
3.1. Pacientes y obtención de muestras.....	11

3.2.	Líneas celulares.	11
3.3.	Microorganismos.	12
3.4.	Cultivos primarios de macrófagos peritoneales.....	12
3.5.	Diferenciación celular.	12
3.6.	Preparación de soluciones de hidrazonas.	12
3.7.	Ensayo de viabilidad celular por MTT.	13
3.8.	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	13
3.9.	Actividad antitumoral de hidrazonas.	14
3.10.	Actividad antiinflamatoria de hidrazonas.	14
3.11.	Actividad antifúngica de hidrazonas.	14
3.12.	Actividad antibacteriana de hidrazonas.	15
3.13.	Análisis estadístico.	15
4.	Resultados	16
4.1.	El compuesto 4 mostró actividad antitumoral en un modelo celular <i>in vitro</i>	16
4.2.	El compuesto 4 presentó baja citotoxicidad sobre macrófagos derivados de la línea celular HL-60	22
4.3.	Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos derivados de la línea HL-60	22
4.4.	Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos peritoneales en endometriosis.....	26
4.5.	Actividad antimicrobiana	29
5.	Discusión.....	36
6.	Conclusiones.....	41
7.	Referencias	42
8.	Anexo	55
8.1.	Anexo 1. Curva de estándares para las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α	55

Índice de Figuras

Figura 1. Representación de la estructura química de hidrazidas e hidrazonas	1
Figura 2. Ensayo de citotoxicidad del compuesto 4 sobre células HL-60	16
Figura 3. Curva de crecimiento de células HL-60 y K562 tratadas con el compuesto 4.....	17
Figura 4. Citotoxicidad del compuesto 4 sobre las líneas celulares HL-60 y K562.....	18
Figura 5. Citotoxicidad inducida por los compuestos 1-3 y 5-7 en línea celular HL-60	20
Figura 6. Citotoxicidad inducida por los compuestos 1-3 y 5-7 en línea celular K562.....	21
Figura 7. Citotoxicidad inducida por DMSO sobre las líneas celulares HL-60 y K562	21
Figura 8. Actividad citotóxica del compuesto 4 frente a células tipo macrófagos derivadas de la línea HL-60.....	22
Figura 9. Niveles de TNF- α producidos por macrófagos derivados de la línea celular HL-60 tratadas con LPS y el compuesto 4	23
Figura 10. Niveles de IL-1 β producidos por macrófagos derivados de la línea celular HL-60 en respuesta a LPS y tratadas con el compuesto 4.....	24
Figura 11. Compuestos con actividad sobre IL-1 β en macrófagos derivados de la línea celular HL-60 estimulados con LPS.....	24
Figura 12. Efecto de la concentración de DMSO sobre la producción de IL-1 β en macrófagos derivados de la línea celular HL-60.....	25
Figura 13. Macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis	27
Figura 14. Nivel de citoquinas producidas por macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis.....	28
Figura 15. Controles utilizados en el ensayo antifúngico contra <i>C. albicans</i>	30
Figura 16. Actividad citotóxica de la serie de hidrazonas frente a <i>C. albicans</i>	31
Figura 17. Actividad estimuladora de crecimiento fúngico de la serie de hidrazonas frente a <i>C. albicans</i>	32
Figura 18. Controles utilizados en el ensayo antibacteriano contra <i>E. coli</i>	33
Figura 19. Actividad citotóxica de la serie de hidrazonas frente a <i>E. coli</i>	34
Figura 20. Actividad estimuladora del crecimiento de <i>E. coli</i> de la serie de hidrazonas ...	35

Índice de Tablas

Tabla 1. Variación de las citoquinas presentes en el espacio intraperitoneal en mujeres con endometriosis vs. mujeres sanas	9
Tabla 2. Actividad antitumoral del compuesto 4, derivado de hidrazona, sobre células HL-60 y K562.....	17
Tabla 3. Compuestos con baja actividad antitumoral sobre células HL-60 y K562.....	19
Tabla 4. Disminución del metabolismo celular de macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis frente al tratamiento con el compuesto 4.....	26

Abreviaturas

AA	: Ácido araquidónico
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
COX-1	: Ciclooxigenasa 1
COX-2	: Ciclooxigenasa 2
IC50	: Concentración inhibitoria media
MIC	: Concentración inhibitoria mínima
DMSO	: Dimetilsulfóxido
ELISA	: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
TGF- β	: Factor de crecimiento transformante β
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral α
IL-1 β	: Interleuquina 1 β
IL-6	: Interleuquina 6
IL-10	: Interleuquina 10
IL-4	: Interleuquina 4
IL-8	: Interleuquina 8
I κ B	: Inhibidor de NF- κ B
IKK β	: I κ B quinasa β
LPS	: Lipopolisacárido
MCC-DMEN	: Medio completo DMEN
MCC-RPMI	: Medio completo RPMI
PMA	: <i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PBS	: Tampón fosfato salino

Resumen

Las hidrazidas son grupo de compuestos muy versátiles, ya que poseen una gran capacidad para formar nuevos derivados. Debido a esto, se les han atribuido diversas actividades farmacológicas, siendo las más importantes la actividad anticancerígena, antiinflamatoria, analgésica y antimicrobiana. Por otro lado, la endometriosis es un trastorno ginecológico de difícil diagnóstico, en donde los macrófagos peritoneales cumplen un importante rol, ya que se ha visto un aumento de este tipo celular y sus citoquinas en mujeres que padecen esta patología. El objetivo de este estudio fue demostrar que una serie de 7 nuevos compuestos derivados de hidrazonas presentaba actividad antitumoral sobre células mieloides, antiinflamatoria y antimicrobiana en modelos *in vitro*. Como modelos para la actividad antitumoral, se utilizaron dos líneas celulares mieloides, provenientes de leucemia promielocítica humana (HL-60) y leucemia eritromieloide aguda (K562), mientras que para la actividad antiinflamatoria se utilizaron las células HL-60 diferenciadas a células tipo macrófagos y macrófagos peritoneales derivados de endometriosis, en estas células también se determinó la toxicidad de la serie de compuestos. Además, se evaluaron los compuestos sobre los microorganismos oportunistas *Escherichia coli* y *Candida albicans*. De la serie de compuestos evaluados, el compuesto 4 fue el que evidenció resultados más atractivos, ya que mostró tener una potente actividad antiproliferativa sobre el modelo tumoral celular, sin afectar la viabilidad de células diferenciadas. Por otro lado, se observó que este compuesto fue capaz de reducir significativamente los niveles basales de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en células tipo macrófagos derivados de la línea celular HL-60, además de mostrar una tendencia a la disminución de los niveles basales de TNF- α e IL-6 producidos por macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis. Sin embargo, dicho compuesto no tuvo ninguna actividad sobre *E. coli*, y con la dosis 1 μ M mostró un aumento en el crecimiento de *C. albicans*. Además, los ensayos llevados a cabo con macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis mostraron un aumento significativo en los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas por aquellos macrófagos que fueron estimulados con LPS, con respecto a los que no recibieron estímulo. En conjunto, estos hallazgos sugieren que, de la serie de compuestos evaluados, el compuesto 4 posee actividad antiproliferativa sobre líneas celulares tumorales mieloides y una leve actividad antiinflamatoria en macrófagos, sin afectar a los microorganismos oportunistas y células diferenciadas evaluadas.

Summary:

Biological activity of a new series of hydrazone derivatives and their therapeutic potential
in endometriosis

Hydrazides are a group of very versatile compounds since they can form many new derivatives. Due to this, various pharmacological activities have been attributed to these compounds, the most important being anticancer, anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial activity. On the other hand, endometriosis corresponds to a gynecological disorder of difficult diagnosis in which peritoneal macrophages fulfill an important role, since an increase of this cell type and its cytokines has been seen in women suffering from this pathology. The objective of this study was to demonstrate that a series of 7 new compounds derived from hydrazones presented antitumor activity on myeloid cells, anti-inflammatory and antimicrobial activity in *in vitro* models. As models for antitumor activity, two myeloid cell lines were used, from human promyelocytic leukemia (HL-60) and chronic erythromyloid leukemia (K562), HL-60 cells differentiated to macrophage-like cells and peritoneal macrophages derived from endometriosis were used for anti-inflammatory activity, the toxicity of the series of compounds was also determined in these cells. In addition, the compounds on the opportunistic microorganisms *Escherichia coli* and *Candida albicans* were evaluated. Of the series of compounds evaluated, compound 4 was the one that displayed the more attractive results, since it exhibited a potent antiproliferative activity on the tumor cell model, without affecting the viability of differentiated cells. On the other hand, this compound significantly reduced the basal levels of TNF- α proinflammatory cytokine in macrophage-like cells derived from the HL-60 cell line, in addition to showing a tendency to decrease basal levels of TNF- α and IL-6 produced by peritoneal macrophages of women with endometriosis. However, said compound had no activity on *E. coli*, and with a 1 μ M dosage it showed an increase in the growth of *C. albicans*. In addition, trials conducted with peritoneal macrophages of women with endometriosis showed a significant increase in the levels of proinflammatory cytokines produced by macrophages stimulated with LPS, compared to those who did not receive stimulation. Overall, these findings suggest that, of the series of compounds evaluated, compound 4 has antiproliferative activity on myeloid tumor cell lines and mild anti-inflammatory activity in macrophage-like cells, without affecting the opportunistic microorganisms and differentiated cells that were evaluated.

1. Antecedentes

1.1. Hidrazidas

Los derivados de hidrazidas corresponden a un grupo de compuestos orgánicos que en su estructura química poseen el grupo funcional hidrazida (-NR-NR₂-) [1] (Figura 1A). Dicho grupo funcional permite la unión de hasta 4 sustituyentes en donde uno de ellos corresponde a un grupo acilo (Figura 1A). Dicha capacidad de unión con múltiples sustituyentes, le otorga una gran versatilidad a la hora de formar nuevos compuestos, siendo la principal ruta de síntesis el calentamiento de las hidrazidas con ácidos carboxílicos o heterocarboxílicos y diferentes aldehídos o cetonas en disolventes orgánicos [2, 3], y su estructura puede ser confirmada fácilmente mediante métodos espectrales [4]. Uno de los derivados de hidrazidas más estudiados son las hidrazonas, estas se diferencian de las hidrazidas principalmente por poseer un doble enlace en su estructura (R₁R₂C = NR₃ - NR₄) (Figura 1B). Además de la versatilidad para la formación de nuevos compuestos, una de las ventajas de las hidrazidas-hidrazonas es su capacidad para actuar como dadores y receptores de electrones, permitiéndoles interactuar con diversos aminoácidos [5]. Esto les ha otorgado un gran interés farmacológico en los últimos años, ya que fármacos ampliamente utilizados como la nitrofurazona [6], furazolidona [7] y nitrofurantoína [8] contienen la fracción típica hidrazida-hidrazona [4]. Debido a lo anteriormente expuesto, en esta sección se revisarán los hallazgos más importantes de las actividades biológicas informadas para los derivados de hidrazidas-hidrazonas, en donde destacan las actividades antiinflamatoria y antibacteriana.

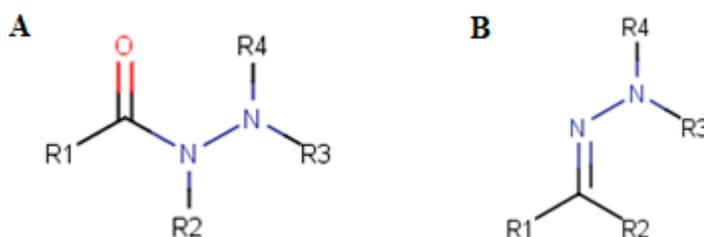


Figura 1. Representación de la estructura química de hidrazidas e hidrazonas. Se presenta la estructura de hidrazidas (A) e hidrazonas (B), donde R = alquilo, arilo o H. Los átomos y enlaces en azul indican la función hidrazida (A) o hidrazona (B) constante, mientras que el marcado en rojo (A) indica el grupo acilo siempre presente en hidrazidas.

1.1.1. Actividad antitumoral/anticancerígena

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 [9], el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo antes de los 70 años, siendo la segunda en 91 de 172 países. Debido a este hecho, el cáncer constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, cuyos gastos asociados van en aumento año tras año [10]. A pesar de que existen tratamientos disponibles, solo son eficaces cuando el cáncer es detectado tempranamente, y uno de los principales problemas de los quimioterapéuticos utilizados actualmente es la falta de selectividad que puede desencadenar terribles efectos adversos; además, en muchos casos es posible la reactivación de la patología [11]. Es por ello, que muchos grupos de investigación se han centrado en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas las ofrecidas por los compuestos derivados de hidrazidas-hidrazonas.

Entre los hallazgos más recientes relacionados con los efectos antitumorales de las hidrazidas, destaca el trabajo de Sreenivasulu *et al.* [12], quienes sintetizaron una nueva serie de compuestos y determinaron su capacidad antiproliferativa *in vitro* en diversas líneas celulares derivadas de distintos tipos de cáncer. Uno de los compuestos de dicha serie demostró inducir la apoptosis *in vitro* en las células cancerígenas, a través de la vía de proteínas kinasa activadas por mitógenos (MAPK).

Además de los resultados de Sreenivasulu *et al.* [12], existe amplia evidencia sobre la actividad antiproliferativa *in vitro* de diversos derivados de hidrazidas sobre diversas líneas celulares de cáncer [13], como por ejemplo, el cáncer de pulmón [14], leucemia promielocítica [15], cáncer de colon [16], cáncer de próstata [17] y cáncer de mama [18-20], de este último, incluso se ha reportado una concentración inhibitoria media (IC₅₀) de 6,7 nM sobre varias líneas celulares [14].

1.1.2. Actividad antiinflamatoria y analgésica

El tratamiento del dolor y la inflamación sigue siendo un problema en la actualidad, ya que, a pesar de existir una amplia gama de fármacos con este fin, la mayoría produce efectos adversos insostenibles en terapias a largo plazo. Actualmente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) siguen siendo el tratamiento más utilizado [21]. Este tipo de fármacos inhibe de manera no selectiva las dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2),

evitando el metabolismo del ácido araquidónico (AA) y la formación de prostaglandinas (PGs), las cuales desencadenan un aumento de la permeabilidad vascular, edema, hiperalgesia, pirexia e inflamación y posibles úlceras gástricas [22, 23]. Existen además nuevas estrategias que se centran en la inhibición selectiva de COX-2 [24, 25], pero lamentablemente, también se han observado efectos secundarios relacionados con su uso, especialmente a nivel renal [26]. Estos hechos destacan la importancia de investigar nuevos fármacos con este fin, siendo de gran atractivo farmacológico los derivados de hidrazidas-hidrazonas, ya que varios grupos han descrito actividades antiinflamatorias y analgésicas para estos compuestos, además de otras funciones inmunomoduladoras.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria, existen diversos estudios que avalan este efecto. Por ejemplo, se informó que dos compuestos derivados de hidrazonas poseían actividad *in vivo* en un modelo murino de edema en la pata trasera inducido por carragenano, alcanzando niveles significativos con una dosis de 100 mg/kg a los 90 minutos, pero desafortunadamente, a una dosis de 200 mg/kg los compuestos presentaron alto riesgo de ulceración [27]. Mohammed *et al.* en 2014 [28], describieron que algunos de estos compuestos poseían mejor actividad antiinflamatoria *in vivo* que el diclofenaco e incluso fueron menos ulcerogénicos que la indometacina usada como referencia. Otro grupo evaluó la actividad de los derivados de hidrazidas-hidrazonas frente a la inflamación pulmonar inducida por alérgenos en un modelo murino, demostrando que con una dosis de 10 mg/kg, uno de sus compuestos era capaz de reducir significativamente todos los marcadores utilizados para evaluar la inflamación, especialmente inhibiendo las citoquinas proinflamatorias y la proliferación de células T. Uno de los hallazgos de actividad antiinflamatoria más alentador hasta el momento, es el de Avila *et al.* [29], ya que incluye un mecanismo de acción que involucra la vía de señalización que activa el factor transcripcional NF- κ B, involucrado en la promoción de la inflamación. Estos autores mostraron que una nueva acetilhidrazona inhibía selectivamente la I κ B quinasa β (IKK β) *in vitro* y, además, suprimía la formación de edema inducido por AA de manera dosis dependiente en un modelo murino [29]. Teniendo en cuenta que IKK β es una de las encargadas de fosforilar y así promover la degradación del inhibidor de NF- κ B (I κ B) [30,31], su inhibición reduciría la función proinflamatoria de NF- κ B.

Con respecto a la actividad exclusivamente analgésica de los derivados de hidrazidas, varios estudios han demostrado que sus series de compuestos son activos sobre modelos murinos mediante el método de contracciones abdominales inducidas por ácido acético [32, 23] o fórmico [33], reportando valores de IC₅₀ de incluso 1,6 mg/kg [32]. Adicionalmente, Bhandari *et al.* [34] informaron que su serie de compuestos además de proporcionar una inhibición del dolor del 68,66%, presentaban una significativa actividad antiinflamatoria *in vivo*.

1.1.3. Actividad antimicrobiana

El tratamiento de las enfermedades infecciosas, tanto bacterianas como fúngicas, sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, debido sobre todo al creciente número de nuevos patógenos resistentes a múltiples fármacos (MDR) [35, 36]. De hecho, es frecuente encontrar aislados de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causante de la tuberculosis, que expresan genes de resistencia a antibióticos [37], lo cual es especialmente grave, ya que la tuberculosis constituye una de las principales causas de muerte entre pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) [38]. Por todo esto, se trabaja arduamente en el desarrollo de nuevos antibióticos y antifúngicos que puedan cubrir las necesidades sanitarias actuales.

En los últimos años se han reportado diversos hallazgos sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de diferentes tipos de derivados de hidrazidas-hidrazonas [39, 40], tanto sobre bacterias Gram negativas [41, 39] como Gram positivas [42, 43]. Entre los hallazgos que involucran a bacterias Gram negativas, destaca el trabajo de Morjan *et al.* [41], quienes informaron que dos de los compuestos de su serie de derivados de hidrazidas-hidrazonas, 3a y 3e, mostraban una fuerte actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, alcanzando una concentración inhibitoria mínima (MIC) de 0,022 y 0,195 µg/mL para 3a y 3e, respectivamente. Otro grupo informó que uno de sus compuestos alcanzó una MIC de 6,25 µg/mL sobre *Salmonella typhimurium*, actividad dos veces mayor que la que presentaba el cloranfenicol [39]. En tanto Popiołek y Biernasiuk [42] informaron que tres de sus compuestos poseían una potente actividad bactericida sobre varias cepas de bacterias Gram positivas, alcanzando valores de MIC de entre 0,488 y 7,81 µg/mL, y mostrando una actividad mayor que antibióticos como la cefuroxima o ampicilina. También, dos grupos independientes informaron que sus

compuestos eran activos frente a *Enterococcus faecalis*, ambos con MIC del orden nM [39, 44] y más potentes que sus antibióticos de referencia [44].

Sobre *M. tuberculosis* se han reportado variados hallazgos que demuestran la actividad bactericida de derivados de hidrazidas-hidrazonas principalmente sobre la cepa virulenta H37Rv con MIC muy alentadoras [45-47], además de otras cepas incluso resistentes a isoniazida (INH) [48-50]. Un hallazgo especialmente relevante fue el de John *et al.* en 2016 [51], quienes caracterizaron el 2-hidroxi-1-naftaldehído isonicotinoilhidrazona, una molécula conocida por inhibir la replicación transcripcional del VIH-1, como un nuevo inhibidor selectivo de las aminopeptidasas de metionina (MetAP) de *M. tuberculosis*.

También existe amplia evidencia sobre la actividad antifúngica de los derivados de hidrazidas principalmente sobre *Candida spp*, en donde algunos compuestos han logrado una fuerte actividad sobre cepas de la especie *C. albicans*, pero sin superar la actividad de otros antifúngicos comerciales como el fluconazol [52], mientras que otros sí han conseguido niveles más bajos en esta especie [53]. Rutkauskas *et al.* [53] informaron que dos de sus compuestos mostraban una MIC de 1,9 y 0,9 µg/mL contra *C. tenuis*, y uno además presentaba una MIC de 3,9 µg/mL sobre *Aspergillus niger*. Otros grupos hicieron ensayos antifúngicos sobre múltiples cepas de *Candida spp*, obteniendo valores de MIC por debajo de 0,25 µg/mL [54-56].

1.1.4. Actividad anticonvulsivante

La epilepsia es un trastorno neurológico crónico, caracterizado por descargas interictales sincrónicas, y actualmente solo cuenta con terapias paliativas que evitan las convulsiones [57]. Por ello, es imprescindible el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces y con menor neurotoxicidad.

Varios grupos de investigación se han centrado en estudiar la actividad anticonvulsivante de los derivados de hidrazidas-hidrazonas. La mayoría ha reportado que uno o más de sus compuestos posee alta actividad anticonvulsivante *in vivo* mediante la prueba de convulsión máxima por electroshock [58-60] convulsión por pentilene-tetrazon subcutáneo [59, 60], neurotoxicidad [59] y la prueba de crisis psicomotora de 6 Hz [61] en un modelo murino, con dosis efectivas de entre 30 y 100 mg/kg [58,61].

1.1.5. Otras actividades

Además de las actividades antes mencionadas de los compuestos derivados de hidrazidas-hidrazonas, también se han reportado una diversidad de nuevas funciones para estos. Entre ellas, las que más destacan son: cardioprotectora [62], antihipertensiva [63], inhibidora de la agregación plaquetaria [64], antiviral frente al virus de VIH-1 mediante la inhibición del ensamblaje de la proteína de la cápside [65], y antiprotozoarios frente a *Trypanosoma cruzi* [66-68] y *Taxoplasma gondii* [69].

Además, algunos investigadores han descrito la actividad antioxidante de compuestos derivados de hidrazidas-hidrazonas *in vitro* en un modelo de células estrelladas de hígado de rata activadas con etanol [70], o mediante la determinación de la capacidad de captación de 2,2-difenil-1-picrilhidacilo (DPPH), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el poder reductor de las moléculas [71].

1.2. Endometriosis

La endometriosis es un trastorno ginecológico dependiente de estrógenos, definido como el crecimiento de estroma y glándulas endometriales en sitios extrauterinos como el peritoneo y los ovarios, entre otros. Los síntomas de la endometriosis pueden variar según el lugar donde se encuentran las lesiones, aunque entre los más comunes se encuentra el dolor pélvico crónico, la dismenorrea o la dispareunia profunda, y puede llegar incluso a producir infertilidad [72]. A pesar de ser una patología benigna, se ha descrito que en algunos casos las células estromales pueden sufrir una transformación maligna y desencadenar cáncer ovárico, por lo que la endometriosis constituye un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer [73].

Actualmente, la endometriosis se considera una patología de difícil diagnóstico, ya que sólo es posible su confirmación mediante técnicas quirúrgicas invasivas como la laparoscopia. En cuanto a los tratamientos disponibles, los más comunes son la supresión hormonal o la escisión/ablación quirúrgica de lesiones visibles, resultando ambas terapias poco eficientes debido a los efectos colaterales que conllevan y a la reaparición de las lesiones, respectivamente [74]. Con respecto a la etiología de la endometriosis, la teoría más comúnmente aceptada es la de Sampson [75], la cual sugiere que durante la menstruación, las células y los fragmentos del endometrio refluyen y se implantan en la cavidad pélvica a

través de las trompas de Falopio. Sin embargo, la menstruación retrógrada se observa en la mayoría de las mujeres, pero solo el 10-24% de ellas desarrollan la patología [76], lo que indicaría la existencia de otros mecanismos que favorecen el desarrollo del tejido endometrial ectópico. Recientemente, García-Peñarrubia *et al.*, [77] han propuesto una etiología multifactorial de la endometriosis, la cual podría involucrar la exposición prenatal a contaminantes químicos que alteran el sistema endocrino, la distancia ano-genital y la microbiota intestinal-genital que podría provocar infecciones subclínicas a lo largo de la infancia y/o pubertad, pudiendo alterar la homeostasis y funcionalidad del sistema inmunitario del aparato genital femenino [77]. En este sentido, también hay evidencias que indican la existencia de una etiología de tipo inmunológica/inflamatoria, ya que, en condiciones de salud los macrófagos deberían ser capaces de eliminar estos fragmentos endometriales ectópicos, sin embargo, se ha visto que esto no ocurre en la endometriosis [78]. Entre los principales hallazgos que apoyan esta teoría destaca el aumento de las concentraciones de macrófagos activados, células T, células B y citoquinas inflamatorias detectados en pacientes con endometriosis [79]. Estos hallazgos señalan a los macrófagos como una pieza clave en la patogenia de la endometriosis, pues se acumulan en el espacio peritoneal de mujeres que padecen esta patología [80].

1.2.1. Macrófagos peritoneales en endometriosis

Los macrófagos son células de estirpe mieloide, pertenecientes al sistema inmunitario innato o natural, siendo efectoras clave tanto en la respuesta innata como en la específica. Son capaces de reconocer y fagocitar patógenos, actúan como células presentadoras de antígenos para activar a las células T y, además, están involucradas en la regeneración de tejidos, entre otras funciones [74].

Los macrófagos son muy versátiles no solo en cuanto a sus funciones, sino que también se ha visto que su fenotipo varía en función del tipo de respuesta inmunitaria requerida ante una agresión tisular. Se ha observado que existen dos principales fenotipos hacia los cuales los macrófagos pueden polarizarse cuando se activan, éstos son el fenotipo clásico o M1 y el alternativo o M2 [81, 82]. Los macrófagos M1 promueven una respuesta de carácter inflamatorio, activados por agentes estresantes o citoquinas proinflamatorias [83, 84] y como consecuencia, secretan otras citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que participan en la

respuesta inicial a un daño tisular o una infección y promueven la respuesta inflamatoria y la proliferación de mioblastos [85]. En contraste, los macrófagos M2 poseen un carácter antiinflamatorio y de reparación tisular, pudiendo ser activados por citoquinas antiinflamatorias [86, 87] y una vez activados, estos secretan más citoquinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y factores reparadores [85].

En el endometrio normal, los macrófagos se encuentran principalmente dentro del epitelio luminal, el estroma subepitelial de la capa funcional, en agregados linfoides y adyacentes al epitelio glandular de la lámina basal [88], constituyen aproximadamente el 10% de la población total de células inmunitarias endometriales en la fase proliferativa [89, 90], y representan la segunda población de leucocitos más abundantes en el endometrio después de las células T [91]. En cuanto a la endometriosis, se ha demostrado que los macrófagos acumulados en el espacio peritoneal de mujeres con esta patología presentan diversas alteraciones a nivel funcional, lo que contribuiría al desarrollo y progresión de la enfermedad [92, 93].

1.2.2. Importancia de las citoquinas en la endometriosis

Diversos hallazgos sugieren que la endometriosis corresponde a una patología inflamatoria que está estrechamente relacionada con el funcionamiento anormal de los macrófagos. Por esta razón, el perfil de secreción de citoquinas por parte de estas células es un objetivo clave de estudio, demostrando que existe una gran diversidad de citoquinas en el espacio intraperitoneal (Tabla 1), lo que podría favorecer al mantenimiento del ambiente inflamatorio. Lamentablemente, existen algunas discordancias entre estudios sobre los niveles de citoquinas en el ambiente peritoneal, ya que la mayoría mide sus niveles directamente desde el fluido peritoneal extraído durante las laparoscopías exploratorias, con procesos no estandarizados a nivel global. Además, se debe tener en cuenta que los niveles de citoquinas pueden variar significativamente en los diversos estadios de la endometriosis.

Entre las citoquinas más estudiadas en endometriosis, se encuentran las de la familia de las interleuquinas (IL), ya que muchas de ellas han mostrado estar aumentadas en el fluido peritoneal e incluso en el suero sanguíneo de pacientes con endometriosis. Entre las interleuquinas más estudiadas se encuentra la IL-6, la cual se ha relacionado con el reclutamiento de monocitos [94], la polarización de macrófagos peritoneales al fenotipo M2

in vitro [82], el número de lesiones generadas en un modelo murino de endometriosis [94], y junto a su receptor (IL-6R) en la señalización reguladora del crecimiento de las células estromales endometriales (ESC) *in vitro* [95]. También, se ha descrito que la disminución de IL-10 e IL-4 en un modelo murino con endometriosis inducida quirúrgicamente, disminuye significativamente el tamaño de las lesiones endometriales [96, 97], lo que concuerda con hallazgos anteriores [98].

Tabla 1. Variación de las citoquinas presentes en el espacio intraperitoneal de mujeres con endometriosis vs. mujeres sanas

Citoquina	Comparación Endometriosis vs Salud	Significancia	Referencia
TNF- α	Sin cambio	n.s.	[99]
	Aumentada, no detectable en mujeres sanas	n.s.	[100]
		-	
MCP-1	Aumentada	*	[99]
		***	[101]
TGF- β 1	Aumentada	***	[101]
		***	[102]
		*	[100]
IL-1 β	Sin cambio	n.s.	[103]
	Aumentada	***	[102]
		***	[104]
IL-6	Aumentada	*	[99]
		*	[103]
		***	[102]
IL-8	Aumentada	**	[99]
		***	[101]

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; n.s. = sin diferencia significativa (no significativa).

De acuerdo con los antecedentes expuestos, en este trabajo se pretende estudiar las actividades inmunomoduladoras de una serie de 7 compuestos derivados de hidrazonas, de los cuales no se muestra su estructura debido a su potencial de patentabilidad. Para investigar las actividades inmunomoduladoras se evaluará la actividad antitumoral de los compuestos frente a líneas celulares tumorales mieloides, la actividad antiinflamatoria sobre células tipo macrófagos derivadas de líneas celulares y macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis. Además, se determinarán los efectos de estos derivados de hidrazonas sobre algunos patógenos oportunistas.

2. Objetivos e hipótesis del trabajo

2.1. Hipótesis

La nueva serie de compuestos derivados de hidrazonas posee actividad inmunomoduladora sobre células de origen mieloide *in vitro*.

2.2. Objetivo general

Demostrar que una nueva serie de compuestos derivados de hidrazonas posee actividad antitumoral sobre células mieloides y antiinflamatoria *in vitro*; además de evaluar su citotoxicidad sobre células diferenciadas y microorganismos.

2.3. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antitumoral de los compuestos sobre células de origen mieloide.
2. Determinar la citotoxicidad de los compuestos sobre células diferenciadas derivadas de líneas celulares y humanas.
3. Determinar si los compuestos modulan la producción de citoquinas proinflamatorias en células tipo macrófagos derivados de líneas celulares y macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis.
4. Estudiar la actividad de los compuestos frente a microorganismos oportunistas.

3. Metodología

3.1. Pacientes y obtención de muestras.

En este estudio se incluyeron 5 pacientes con endometriosis, reclutadas desde la Unidad de Endometriosis del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) y del Hospital General Universitario Reina Sofía (HGURS) de Murcia, España. El diagnóstico de la endometriosis se confirmó mediante anatomía patológica tras el tratamiento quirúrgico. Los criterios de exclusión fueron la toma de antibióticos en la semana previa, gestación en los 6 meses anteriores a la cirugía, lactancia materna en los 6 meses anteriores a la cirugía, tratamiento hormonal en los tres meses anteriores a la intervención y padecer otras enfermedades de naturaleza inflamatoria o autoinmune concomitantes. Todos los sujetos incluidos en el estudio otorgaron un consentimiento informado. Para la obtención de las muestras de fluido peritoneal, al comienzo de la cirugía se realizaron lavados peritoneales con aproximadamente 10 mL de tampón fosfato salino (PBS) estéril. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento durante el mismo día. Los lavados peritoneales fueron centrifugados a 1300 rpm (1319xg) durante 5 min, separando el sobrenadante para almacenarlo a -20 °C, mientras que el sedimento se lavó de 2 a 3 veces con medio completo DMEN (MCC-DMEN) (complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 1000 U/mL de penicilina + estreptomicina), para posteriormente contar las células presentes en la muestra descartando las células muertas mediante la tinción con azul de tripán. Las células fueron congeladas en N₂ líquido poniéndolas en una suspensión de 500 µL de MCC-DMEN más 500 µL de medio de congelación (FBS con 20% de dimetilsulfóxido (DMSO)), o bien se sembraron durante el mismo día como se describe en el apartado 3.4.

3.2. Líneas celulares.

Se utilizaron como modelos tumorales las líneas celulares HL-60 y K562, provenientes de leucemia promielocítica humana y leucemia eritromieloide aguda humana, respectivamente. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio de cultivo completo RPMI (MCC-RPMI) (medio RPMI complementado con 10% de suero bovino fetal y 1000 U/mL de penicilina + estreptomicina).

3.3. Microorganismos.

Se utilizaron dos microorganismos oportunistas, estos fueron, la bacteria *Escherichia coli* DH5 α y el hongo diploide *Candida albicans* cepa SC5314.

3.4. Cultivos primarios de macrófagos peritoneales.

Se sembraron las células previamente lavadas (apartado 3.1) en una placa de 96 pocillos con fondo plano, colocando 100.000 macrófagos por pocillo en 200 μ L de MCC-DMEN y se incubaron 24 horas para permitir la adherencia de los macrófagos. Cuando se usó una muestra previamente congelada, antes de sembrar las células, se lavaron 1 o 2 veces con MCC-DMEN como se describe en 3.1 y se contaron descartando las células muertas mediante la tinción con azul de tripán.

Después de 24 horas de cultivo celular, se descartó el sobrenadante que contenía el resto de los tipos celulares no adheridos y se lavó suavemente con pequeños volúmenes de MCC-DMEN mediante el uso de micropipeta. Finalmente, se añadieron 100 μ L del MCC-DMEN, para acondicionar las células a la espera del tratamiento que se realizó durante el mismo día.

3.5. Diferenciación celular.

Se diferenció la línea celular HL-60 a células tipo macrófagos mediante tratamiento con PMA (*Phorbol Myristate Acetate*). Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos con fondo plano, en donde se sembró 200.000 células en 100 μ L de MCC por pocillo, posteriormente se les añadió PMA hasta una concentración de 0,1 μ g/mL. Las células fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C con 5% de CO₂ y posteriormente se reacondicionaron cambiando el medio antiguo por 100 μ L de MCC-DMEN fresco y se volvieron a incubar en las mismas condiciones durante otras 24 horas.

3.6. Preparación de soluciones de hidrazonas.

Se preparó un stock de los 7 compuestos a ensayar (1-7) de 1 mg/mL en DMSO. A partir de dicho stock se realizaron diluciones seriadas u otro tipo de diluciones en el orden μ M, en MCC-RPMI para los ensayos de viabilidad celular mediante el método de reducción de MTT, o bien RPMI sin rojo fenol para la evaluación de viabilidad celular mediante el equipo de medición de densidad óptica CLARIOstar®.

3.7. Ensayo de viabilidad celular por MTT.

A las células previamente tratadas se les realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, basado en la reducción de dicho compuesto a formazano de color violeta por parte de las enzimas mitocondriales, por lo tanto, a mayor color violeta, mayor cantidad de células vivas. Para ello, se les añadió MTT hasta alcanzar una concentración de 0,22 mg/mL por pocillo y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 2 horas. Posteriormente, las células se lisaron para liberar el formazano sintetizado en el medio intracelular, mediante una solución de lisis (isopropanol acidificado con HCl 0,04 M y 0,1% de detergente NP-40). Los resultados se obtuvieron mediante la lectura espectrofotométrica a 550 nm en el lector de microplacas JUPITER de ASYS o ELx800 de BioTek.

3.8. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para la detección de citoquinas se utilizó kits comerciales de ELISA de la casa comercial Invitrogen de medición indirecta para IL-6, IL-1 β y TNF- α con sensibilidades de 2 pg/mL para IL-6 y IL-1 β , y 4 pg/mL para TNF- α . Cada ensayo se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante, pero con algunas modificaciones de optimización que se detallan en el siguiente protocolo simplificado. Se utilizó placas en tira de Thermo Scientific (*Immuno Clear Standard Modules*), en donde durante el primer día se puso 50 μ L de anticuerpo de captura 1x y se incubó durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 4 veces con 250 μ L de Tween al 0,05% en PBS 1x (PBS-T) y se bloqueó las uniones no específicas mediante la incubación de los pocillos con 150 μ L del diluyente ELISA/ELISPOT durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se volvió a lavar 3 veces como se describió anteriormente, y se añadió 100 μ L de cada muestra en duplicado, diluyente ELISA/ELISPOT para los blancos y se realizó las diluciones seriadas de los estándares, luego se incubó la placa durante la noche a 4 °C. En el último día, se lavó 4 veces como antes se describió, se añadió 50 μ L del anticuerpo de detección 1x, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se volvió a lavar y se añadió 50 μ L de Streptavidina-HRP 1x (IL-6 y TNF- α) o Avidina-HRP (IL-1 β), y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, para luego volver a lavar 6 veces y añadir 100 μ L de sustrato TMB por pocillo. Finalmente, tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente con el sustrato TMB en oscuridad, se puso 50 μ L (IL-6 y IL-1 β) o 100 μ L (TNF- α) de *Stop Solution*

(H₂SO₄ 2N) para frenar la reacción, y se leyó la placa a 450 nm, sustrayendo los valores a 590 nm en el lector de microplacas JUPITER de ASYS.

3.9. Actividad antitumoral de hidrazonas.

Como modelo tumoral se utilizaron las líneas celulares HL-60 y K562. Para el experimento se usó una placa de 96 pocillos con fondo plano, en donde se puso los compuestos en duplicado, un control sin tratamiento y un blanco de fondo, ambos por triplicado. En cada pocillo se colocó 12.500 células contenidas en 50 µL de MCC-RPMI y 50 µL de cada compuesto y se incubó durante 24, 48 o 72 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Tras la incubación, se realizó el ensayo de MTT para determinar la toxicidad de cada compuesto. Adicionalmente, se realizó el ensayo de MTT sobre células HL-60 diferenciadas tratadas con los mismos compuestos y cultivos primarios de macrófagos peritoneales de pacientes con endometriosis, tratados con el compuesto más activo (denominado compuesto 4).

3.10. Actividad antiinflamatoria de hidrazonas.

Se evaluó la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de modelos celulares *in vitro* en presencia de los nuevos derivados de hidrazonas. Concretamente, sobre las células HL-60 previamente diferenciadas a células de tipo macrófago como se ha detallado anteriormente en el apartado 3.5. Para ello, se les retiró el medio antiguo a las células ya diferenciadas y se reemplazó por 200 µL del compuesto a la concentración deseada, para luego incubar 30 min a 37 °C y 5% de CO₂ antes de añadir lipopolisacárido (LPS) 0,1 µg/mL para la activación de los macrófagos. Posteriormente, las células se incubaron durante 24 horas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación, se traspasó el sobrenadante con citoquinas solubles a una nueva placa de 96 pocillos y se mantuvo a -20 °C hasta el momento de realizar el ensayo de ELISA para cuantificar las citoquinas proinflamatorias mencionadas en 3.8. Adicionalmente, se realizó el mismo procedimiento antes descrito sobre un cultivo primario de macrófagos peritoneales obtenidos de mujeres con endometriosis.

3.11. Actividad antifúngica de hidrazonas.

Se evaluó la capacidad antifúngica de la serie de hidrazonas sobre *C. albicans* SC5314 en su etapa de crecimiento exponencial, la cual se cultivó previamente en agar sólido *Yeast extract Peptona Dextrosa* (YPD). Se preparó el experimento en una placa de 96 pocillos con fondo

plano, en donde se incluyó un control con el antifúngico Anfotericina B a 25, 41,6 y 62,5 µg/mL, con cada dilución en duplicado, un control sin tratar y el blanco de fondo (solo medio), ambos en triplicado. En cada pocillo se puso 100.000 células contenidas en 100 µL de medio RPMI sin rojo fenol y 100 µL del compuesto correspondiente, luego se registró la absorbancia a 530 nm continuamente durante 48 horas a 37 °C en el equipo CLARIOstar®.

3.12. Actividad antibacteriana de hidrazonas.

Se ensayó la actividad antibacteriana en *E. coli* DH5α en fase de crecimiento exponencial, para lo que se cultivó previamente en agar sólido Luria-Bertani (LB). Se preparó un stock de *E. coli* con OD 0,2 en medio RPMI sin rojo fenol y se agregaron los compuestos a ensayar en el mismo medio. Se realizó el experimento en una placa de 96 pocillos con fondo plano, en donde se incluyó un control con el antibiótico penicilina + estreptomicina a 2500 U/mL, 1670 U/mL y 1250 U/mL, cada dilución en duplicado, un control sin tratar y el blanco de fondo (solo medio), ambos en triplicado. En cada pocillo se colocó 100 µL de suspensión bacteriana y 100 µL del compuesto correspondiente, para posteriormente registrar la absorbancia a 530 nm durante 24 horas a 37 °C en el equipo CLARIOstar®.

3.13. Análisis estadístico.

Para los ensayos de actividad antitumoral no se realizó ninguna prueba estadística, sino que se calcularon las medias y sus errores típicos, informándose la concentración inhibitoria media (IC₅₀) calculada a partir de dichos datos. En cambio, para la actividad antiinflamatoria sobre células tipo macrófagos determinada por la modulación en la producción de citoquinas proinflamatorias, se realizó la prueba de ANOVA de una cola en primera instancia, y en los resultados que dieron significancia estadística mediante esta prueba, se les realizó un segundo análisis mediante la prueba de Dunnet, los controles con y sin estímulo por LPS fueron comparados mediante la prueba T de Student. La diferencia en la producción de citoquinas por parte de los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis se analizó mediante ANOVA de una cola, pero al tener varianzas desiguales también se realizó la prueba T de Student. Para la actividad antimicrobiana también se informaron solamente las medias con sus errores típicos. Todos los análisis fueron realizados mediante el software GraphPrism 8.0.2.

4. Resultados

4.1. El compuesto 4 mostró actividad antitumoral en un modelo celular *in vitro*.

Se evaluó la actividad antitumoral de una serie de 7 compuestos derivados de hidrazonas. Para ello, se determinó la citotoxicidad de dicha serie sobre la línea celular HL-60, proveniente de leucemia promielocítica humana y K562, proveniente de leucemia eritromieloide aguda, mediante el método colorimétrico de reducción de MTT. De la serie de compuestos, el denominado compuesto 4 presentó una visible citotoxicidad sobre la línea celular HL-60 con respecto a los controles sin tratamiento (Figura 2), la cual se mantuvo durante las 72 horas de tratamiento. Se pudo ver que el crecimiento en función del tiempo de las células HL-60 y K562 fue evidentemente menor cuando estas fueron tratadas con concentraciones crecientes del compuesto 4 (Figura 3).

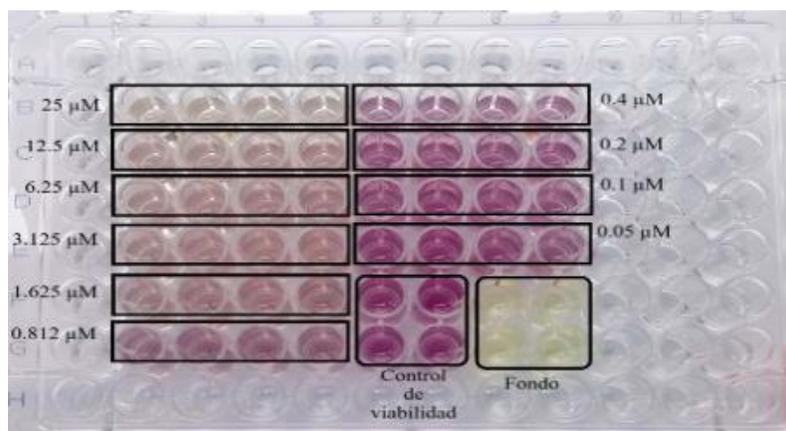


Figura 2. Ensayo de citotoxicidad del compuesto 4 sobre células HL-60. Se muestra una placa representativa del ensayo de MTT tras 48 horas de incubación de las células con los compuestos a concentraciones decrecientes por cuadruplicado. En la parte inferior derecha se muestra el control de viabilidad (sin tratamiento) y el blanco de fondo (medio más MTT y solución de lisis). La mayor viabilidad celular se representa con un color violeta más intenso como se explica en la sección 3.7.

El compuesto 4 alcanzó valores de citotoxicidad máxima (25 μM) para la línea celular HL-60 de $73,22 \pm 4,08\%$, $77,35 \pm 3,94\%$ y $81,25 \pm 5,65\%$ a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, mientras que para la línea celular K562 la citotoxicidad máxima (25 μM) alcanzó el $58,24 \pm 3,95\%$, $66,65 \pm 1,70\%$ y $64,74 \pm 9,67\%$ a las 24, 48 y 72 horas respectivamente (Tabla 2). El compuesto 4 mostró una citotoxicidad similar a lo largo del tiempo sobre ambas líneas celulares, y exhibió un aumento de la citotoxicidad con relación a la concentración con un comportamiento logarítmico, llegando a una meseta alrededor de la concentración 4 μM del compuesto (Figura 4).

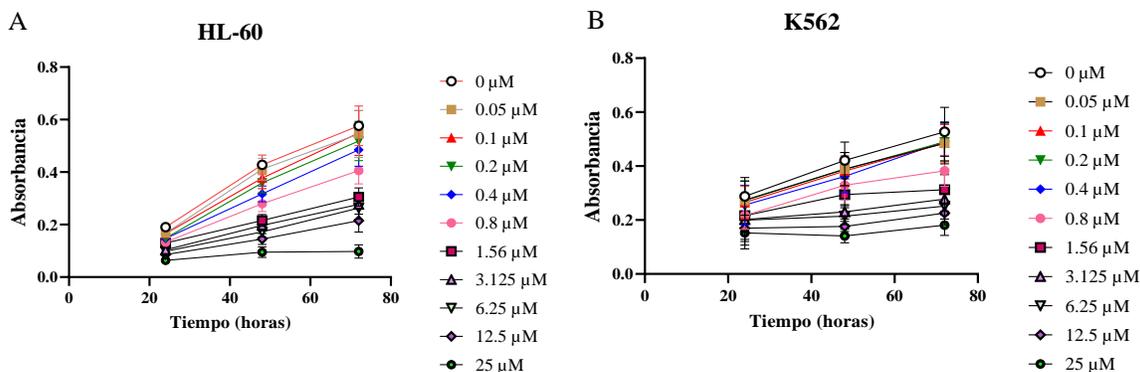


Figura 3. Curva de crecimiento de células HL-60 y K562 tratadas con el compuesto 4. Se representan las curvas de crecimiento de las células HL-60 (A) y K562 (B) tratadas con diferentes concentraciones del compuesto 4. Los gráficos se representan como la absorbancia medida a 550 nm en función del tiempo. Los puntos indican las medias \pm el error típico de la media.

Tabla 2. Actividad antitumoral del compuesto 4, derivado de hidrazona, sobre células HL-60 y K562.

Actividad Antitumoral de compuesto 4			
Células	Tiempo (horas)	Citotoxicidad máxima (%) (25 μM) ¹	IC ₅₀ ²
HL-60	24	73,22 \pm 4,08 (n=7)	2,63 \pm 0,24 (n=7)
	48	77,35 \pm 3,94 (n=8)	1,41 \pm 0,11 (n=8)
	72	81,25 \pm 5,65 (n=6)	1,63 \pm 0,24 (n=6)
K562	24	58,24 \pm 3,95 (n=3)	2,56 \pm 0,67 (n=3)
	48	66,65 \pm 1,70 (n=3)	3,02 \pm 0,37 (n=3)
	72	64,74 \pm 9,67 (n=3)	2,31 \pm 0,15 (n=3)

¹Los resultados se representan como media \pm error típico de la media del % de citotoxicidad con respecto a las células sin tratamiento.

²Concentración inhibitoria media (IC₅₀).

Para evaluar el potencial farmacológico de compuesto 4, se determinó la concentración inhibitoria media (IC₅₀), obteniéndose valores de IC₅₀ para la línea celular HL-60 de 2,63 \pm 0,24, 1,41 \pm 0,11 y 1,63 \pm 0,24 a las 24, 48 y 72 horas, respectivamente (Tabla 2). Para la línea celular K562 los valores de IC₅₀ fueron de 2,56 \pm 0,67, 3,02 \pm 0,37 y 2,31 \pm 0,15 para las 24, 48 y 72 horas respectivamente (Tabla 2).

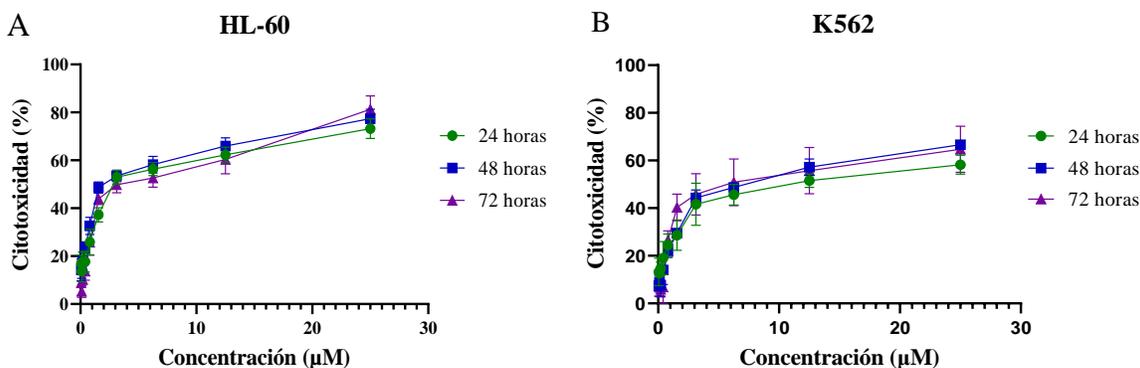


Figura 4. Citotoxicidad del compuesto 4 sobre las líneas celulares HL-60 y K562. En el panel (A) se muestra la citotoxicidad del compuesto 4 sobre la línea celular HL-60 con respecto a las células sin tratamiento, mientras que en el panel (B) sobre K562, ambos a 24, 48 y 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. Los puntos del gráfico se representan con sus barras de error como la media ± error típico de la media, con tamaño muestral para HL-60 de n = 7, 8 y 9 para las 24, 48 y 72 horas respectivamente, mientras que para K562 el tamaño muestral fue n = 3 para los 3 tiempos evaluados.

El resto de los compuestos de la serie (1-3 y 5-7) no presentaron una actividad antitumoral importante a concentraciones bajas ni en HL-60 ni en K562, además de no mostrar un comportamiento con patrón definido (Figura 5 y 6). Aunque con la concentración 25 µM más de uno mostró cierta actividad, esta no fue de atractivo farmacológico debido a las altas concentraciones necesarias, o bien porque dicha actividad no se mantuvo en el tiempo (Tabla 3). Cabe mencionar, que con ninguna de las dos líneas celulares fue posible utilizar como control negativo el tratamiento con el disolvente del stock de los compuestos (DMSO), ya que este no mostró una citotoxicidad directamente proporcional a la concentración usada; además, se comportó de manera diferente estando puro, que cuando se utilizó como disolvente. Se utilizó concentraciones de DMSO en los cultivos de entre 138 µM (9,80%) para los cultivos tratados con la dosis 25 µM de los compuestos y 0,27 µM (0,02%) para el compuesto 4 tratado con la dosis 0,05 µM o bien 4,31 µM (0,30%) para el resto de los compuestos (Figura 7).

Tabla 3. Compuestos con baja actividad antitumoral sobre células HL-60 y K562

Compuestos con baja actividad antitumoral en HL-60			
Compuesto	Tiempo (horas)	Citotoxicidad máxima (%) (25 μM)¹	
		HL-60	K562
1	24	43,60 \pm 5,36 (n=4)	36,40 \pm 11,95 (n=3)
	48	51,58 \pm 9,19 (n=3)	23,17 \pm 8,16 (n=3)
	72	26,82 \pm 7,99 (n=4)	38,27 \pm 1,20 (n=3)
2	24	49,33 \pm 2,58 (n=4)	27,13 \pm 3,75 (n=3)
	48	43,78 \pm 6,60 (n=4)	22,59 \pm 7,40 (n=3)
	72	35,76 \pm 3,70 (n=4)	18,84 \pm 11,04 (n=3)
3	24	54,79 \pm 4,07 (n=4)	20,36 \pm 9,27 (n=3)
	48	42,35 \pm 7,32 (n=4)	28,96 \pm 4,96 (n=3)
	72	36,77 \pm 2,73 (n=4)	16,61 \pm 8,69 (n=3)
5	24	49,09 \pm 6,10 (n=4)	27,06 \pm 3,01 (n=3)
	48	41,17 \pm 3,72 (n=4)	19,63 \pm 4,24 (n=3)
	72	41,96 \pm 6,59 (n=4)	21,53 \pm 8,27 (n=3)
6	24	46,55 \pm 7,85 (n=4)	24,16 \pm 3,64 (n=3)
	48	33,21 \pm 9,42 (n=4)	19,22 \pm 4,00 (n=3)
	72	29,76 \pm 9,09 (n=4)	26,63 \pm 5,77 (n=3)
7	24	33,86 \pm 8,65 (n=6)	26,16 \pm 2,97 (n=3)
	48	38,74 \pm 9,11 (n=7)	23,37 \pm 2,17 (n=3)
	72	47,00 \pm 11,20 (n=6)	21,42 \pm 11,54 (n=3)

¹Los resultados se representan como media \pm error típico de la media del % de citotoxicidad con respecto a las células sin tratamiento.

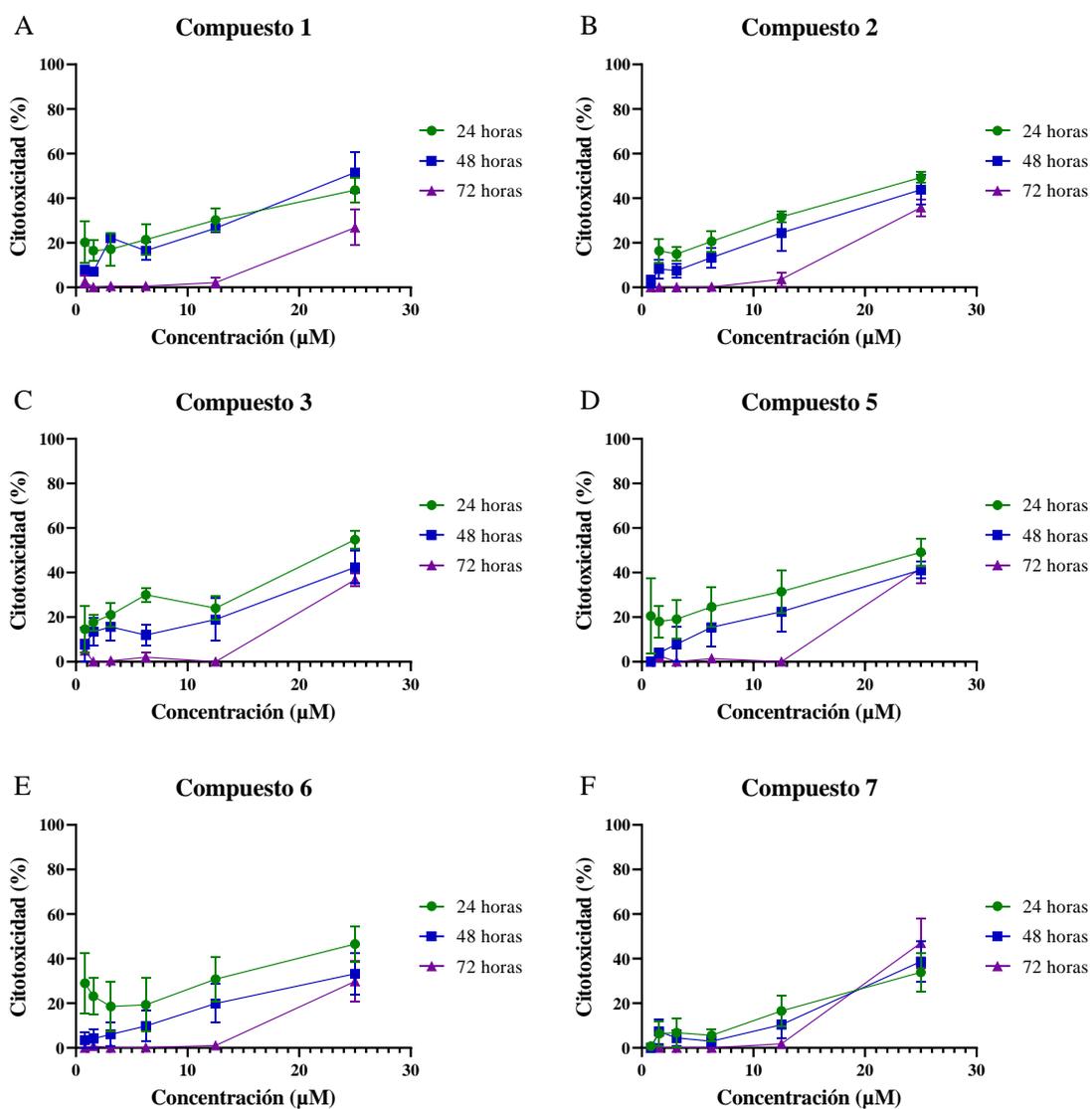


Figura 5. Citotoxicidad inducida por los compuestos 1-3 y 5-7 en línea celular HL-60. En cada panel se muestran los % de citotoxicidad para las células tratadas a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos, con respecto a las células sin tratamiento, a 24, 48 y 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. (A) Compuesto 1, (B) Compuesto 2, (C) Compuesto 3, (D) Compuesto 5, (E) Compuesto 6, (F) Compuesto 7. Los puntos del gráfico se representan con sus barras de error como la media ± error típico de la media, con un tamaño muestral de n = 4 para todos los compuestos, excepto el compuesto 7 que tuvo n = 6 para las 24 y 72 horas de tratamiento, y n = 7 para las 48 horas.

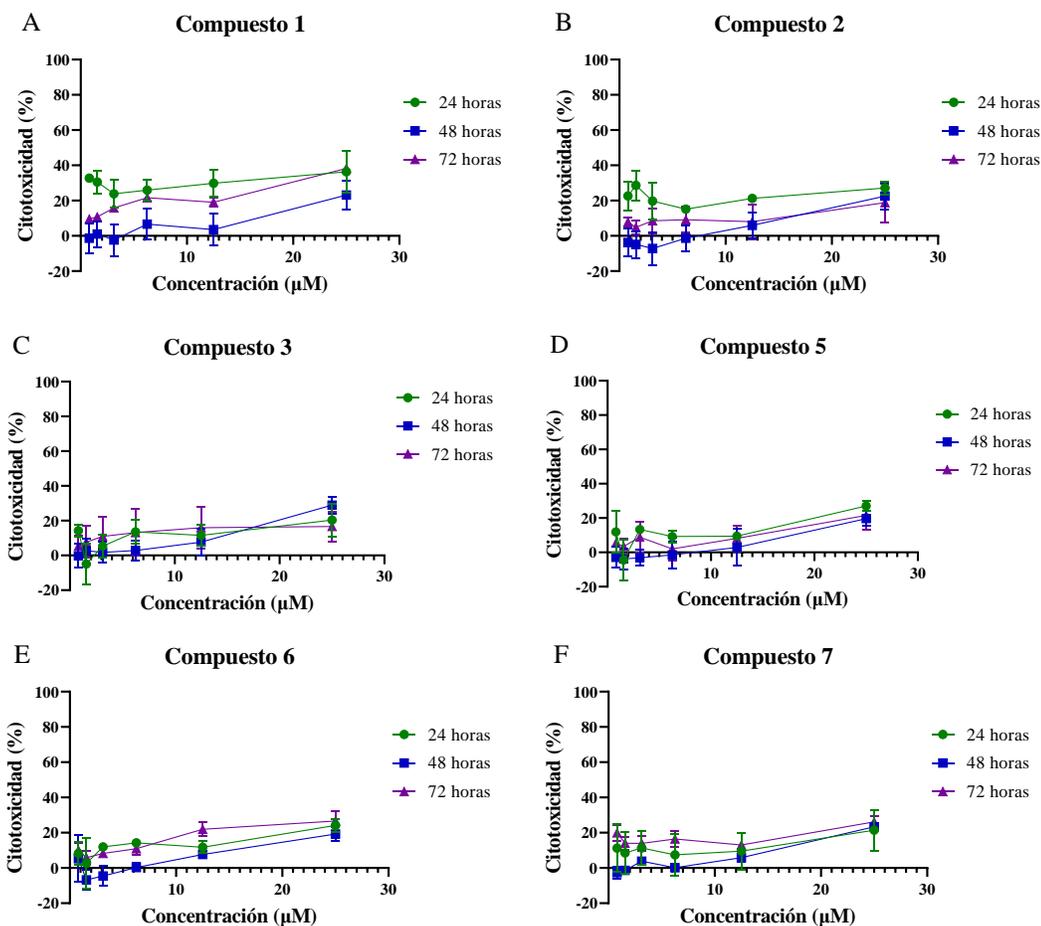


Figura 6. Citotoxicidad inducida por los compuestos 1-3 y 5-7 en línea celular K562. En cada panel se muestran los % de citotoxicidad para las células tratadas con uno de los compuestos con respecto a las células sin tratamiento, a 24, 48 y 72 horas de incubación a 37 °C con 5% de CO₂. (A) Compuesto 1, (B) Compuesto 2, (C) Compuesto 3, (D) Compuesto 5, (E) Compuesto 6, (F) Compuesto 7. Los puntos del gráfico indican la media ± error típico de la media para un tamaño muestral de n = 3.

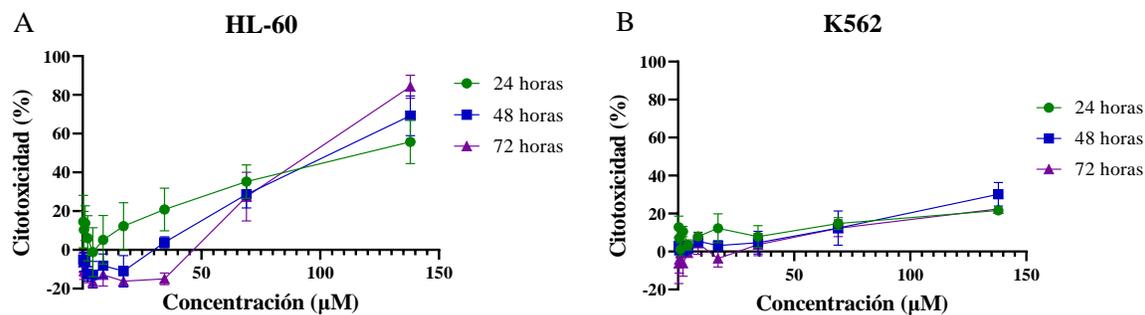


Figura 7. Citotoxicidad inducida por DMSO sobre las líneas celulares HL-60 y K562. Se muestra la actividad citotóxica del DMSO utilizado como disolvente orgánico para los compuestos en las concentraciones presentes en los ensayos sobre la línea celular HL-60 (A), y K562 (B), como control se utilizaron las células sin tratamiento. Los puntos del gráfico se representan con sus barras de error como la media ± error típico de la media, con un tamaño muestral n = 5 para HL-60 y n = 3 para K562.

4.2. El compuesto 4 presentó baja citotoxicidad sobre macrófagos derivados de la línea celular HL-60

Para determinar el efecto del compuesto 4 sobre macrófagos, se evaluó su citotoxicidad sobre células con fenotipo de macrófago derivadas de la línea celular HL-60. Para ello, tras la diferenciación de las células mediante la administración de PMA, se les trató con el compuesto durante 24 horas y se determinó la viabilidad celular mediante el método colorimétrico de reducción de MTT. El compuesto 4 mostró una citotoxicidad máxima (25 μM) sobre estas células de $22,79 \pm 2,32\%$ a las 24 horas de incubación. Además, la citotoxicidad que se obtuvo para la concentración $2,63 \mu\text{M}$ del compuesto 4, correspondiente a la IC_{50} obtenida sobre las células HL-60 sin diferenciar con tratamiento por 24 horas, fue de $11,99 \pm 1,35\%$ (Figura 8).

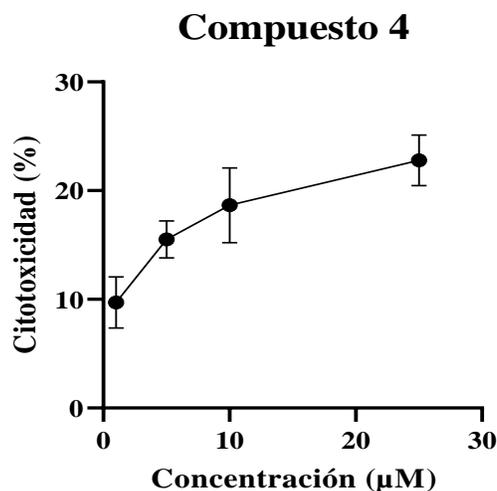


Figura 8. Actividad citotóxica del compuesto 4 frente a células tipo macrófagos derivadas de la línea HL-60. Curva de citotoxicidad para la línea celular HL-60 diferenciada con PMA y estimulada con LPS, cuando se trataron con el compuesto 4, respecto a las mismas células estimulada, pero sin tratamiento. Los puntos del gráfico se representan con sus barras de error como la media \pm error típico de la media, con un tamaño muestral de $n = 9$ para las concentraciones 25, 10 y 1 μM de compuesto, y $n = 5$ para la concentración 5 μM .

4.3. Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos derivados de la línea HL-60

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de una nueva serie de 7 hidrazonas *in vitro*. Para ello, se trató células tipo macrófagos derivados de la línea celular HL-60 con cada compuesto a concentraciones similares a las utilizadas para la actividad antitumoral, y se midió mediante ELISA la concentración de las citoquinas proinflamatorias $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y IL-6 , corrigiendo el número de células mediante los resultados reflejados por los ensayos de viabilidad celular por reducción de MTT. Debido a que el compuesto 4 mostró tener una potente actividad

antitumoral, se evaluó su actividad con concentraciones 1, 5, 10 y 25 μM sin y con estimulación con LPS, mientras que, de los otros 6 compuestos solo se evaluó su actividad antiinflamatoria con concentraciones 1, 10 y 25 μM en células estimuladas con LPS.

Los resultados de los ensayos de ELISA mostraron que el compuesto 4 solo disminuyó significativamente los niveles basales de TNF- α . Se evidenció una disminución significativa con dosis de 5 y 10 μM del compuesto 4 para TNF- α cuando las células no recibieron un estímulo adicional (Figura 9). En el caso de IL-1 β e IL-6, el compuesto 4 no tuvo una actividad significativa con ninguna de las dosis ensayadas. Por otro lado, se vio que solo en IL-1 β existía una diferencia significativa entre las células tipo macrófagos estimuladas con LPS y las no estimuladas (Figura 10).

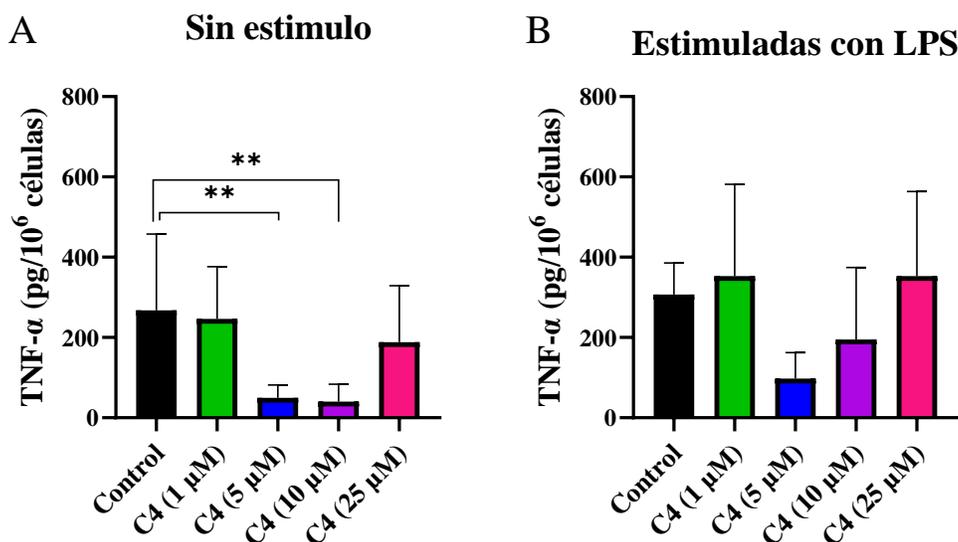


Figura 9. Niveles de TNF- α producidos por macrófagos derivados de la línea celular HL-60 tratadas con LPS y el compuesto 4. Niveles de TNF- α producidos por las células de manera basal (A), y frente a estimulación con LPS (B) tras tratamiento durante 24 horas con 4 concentraciones del compuesto 4 (C4). En los gráficos se representan las barras y desviaciones, como las medias \pm error típico de la media para un tamaño muestral $n = 3$ para las células sin estímulo y $n = 6$ para las células estimuladas. ** = $p < 0,0021$. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una cola seguido por la prueba de Dunnet.

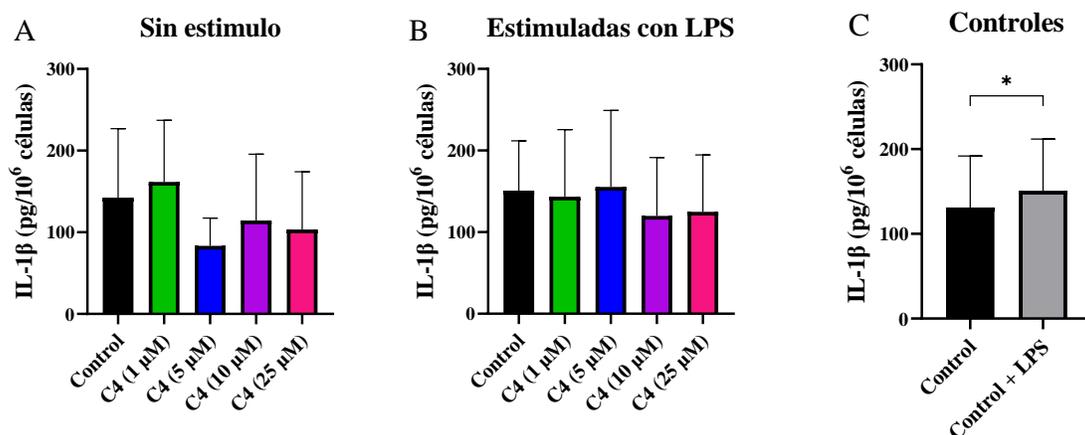


Figura 10. Niveles de IL-1 β producidos por macrófagos derivados de la línea celular HL-60 en respuesta a LPS y tratadas con el compuesto 4. Niveles de IL-1 β producidos por las células de manera basal (A), y frente a estimulación con LPS (B) tras tratamiento durante 24 horas con 4 concentraciones del compuesto 4 (C4). También se representan los niveles de IL-1 β producido por las células sin tratamiento sin estímulo vs las estimuladas con LPS. En los gráficos se representan las barras y desviaciones, como las medias \pm error típico de la media para un tamaño muestral de $n = 4$ para las células sin estímulo y $n = 8$ para las células estimuladas y los controles. * = $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una cola seguido por la prueba de Dunnett. Para la comparación de los controles se utilizó la prueba de T de Student.

Con respecto al resto de los compuestos de la serie (1-3 y 5-7), los compuestos 1 y 6 mostraron disminuir significativamente los niveles de IL-1 β producidos por las células estimuladas con LPS. El compuesto 1 mostró una disminución significativa de IL-1 β con concentraciones 10 y 25 μ M, mientras que el compuesto 6 solo mostró una disminución significativa con la dosis de 25 μ M (Figura 11). Sin embargo, ninguno de los compuestos fue capaz de alterar los niveles de TNF- α e IL-6.

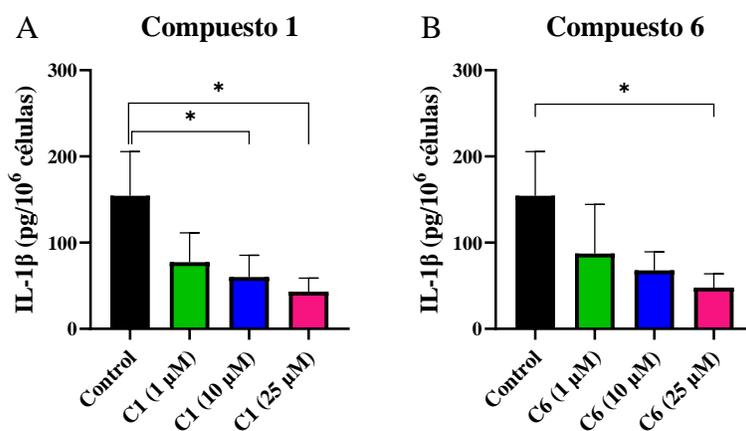


Figura 11. Compuestos con actividad sobre IL-1 β en macrófagos derivados de la línea celular HL-60 estimulados con LPS. Niveles de IL-1 β producidos por macrófagos derivados de la línea celular HL-60,

estimuladas con LPS y tratadas durante 24 horas con el compuesto 1 (A), compuesto 3 (B), compuesto 6 (C) y compuesto 7 (D). En los gráficos se representan las barras y desviaciones, como las medias \pm error típico de la media para un tamaño muestral $n = 3$. * = $p < 0,033$. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una cola seguido por la prueba de Dunnet.

A modo de control, se evaluó la actividad del DMSO que se utilizó como disolvente de las soluciones madre de los compuestos, con las concentraciones máximas presentes en los cultivos. Es decir, 138 μM (9,80%), 55,20 μM (3,92%) y 5,52 μM (0,39%) para las dosis 25 μM , 10 μM y 1 μM de los compuestos respectivamente. Los resultados reflejaron que el DMSO por sí solo no disminuyó significativamente los niveles TNF- α ni de IL-6. Sin embargo, se observó una disminución significativa en los niveles de IL-1 β con la concentración 138 μM , la cual fue la concentración máxima presente en los cultivos cuando se trataron con la dosis 25 μM de los compuestos (Figura 12). A pesar de esto, al no obtener resultados significativos para los demás compuestos con esta dosis, se puede ver como al igual que con el efecto antitumoral, el DMSO puro no se comportaría de la misma manera que cuando actúa como disolvente.

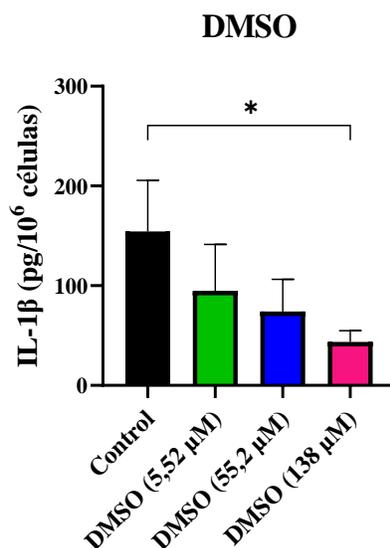


Figura 12. Efecto de la concentración de DMSO sobre la producción de IL-1 β en macrófagos derivados de la línea celular HL-60. Se muestra el efecto del disolvente orgánico DMSO, utilizado para disolver los compuestos en las soluciones madre, con las concentraciones máximas presentes en los cultivos. Los gráficos representan los niveles de IL-1 β , mediante barras que muestran la media \pm error típico de la media para un tamaño muestral $n = 3$. * = $p < 0,033$. Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una cola seguido por la prueba de Dunnet.

4.4. Actividad antiinflamatoria sobre macrófagos peritoneales en endometriosis

Tras verificar que el compuesto 4 disminuyó los niveles de TNF- α en células de tipo macrófago derivadas de la línea celular HL-60 (Sección 4.3), se decidió evaluar su actividad frente a cultivos primarios de macrófagos peritoneales provenientes de 5 mujeres con diferentes estadios de endometriosis. Dichos macrófagos se estimularon con LPS para simular el ambiente inflamatorio presente en la patología, o bien se utilizaron sin estímulo para determinar la actividad del compuesto 4 sobre los niveles basales de citoquinas proinflamatorias.

Previo a realizar los ensayos para la cuantificación de las citoquinas, se realizó un ensayo de viabilidad celular por reducción de MTT sobre los macrófagos luego del tratamiento con el compuesto 4. Los resultados sugirieron que la citotoxicidad máxima del compuesto 4 (con la dosis 20 μ M) sobre los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis fue de $31,46 \pm 4,14\%$ cuando estos fueron estimulados con LPS y de $21,97 \pm 8,83$ cuando estos no recibieron un estímulo adicional (Tabla 4). Sin embargo, mediante análisis al microscopio se observó que el número de macrófagos no disminuyó, sino que más bien lo hizo la cantidad de formazano producido por los macrófagos (Figura 13). Por lo tanto, no se trataría de citotoxicidad del compuesto 4 sobre los macrófagos peritoneales, sino más bien de una disminución en el metabolismo de las células, mostrando un menor metabolismo cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS (Tabla 4). Debido a esto, no se corrigió las concentraciones de citoquinas obtenidas mediante ELISA con los resultados de viabilidad, como se hizo con las células tipo macrófagos derivadas de HL-60. Cabe mencionar que estos ensayos también fueron útiles para evaluar el comportamiento de los macrófagos peritoneales frente a condiciones control y cómo estos respondieron al estímulo con LPS.

Tabla 4. Disminución del metabolismo celular de macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis frente al tratamiento con el compuesto 4.

Tratamiento	Disminución del metabolismo (%) ¹
Compuesto 4 (20 μ M) + LPS	$31,46 \pm 4,14$
Compuesto 4 (20 μ M)	$21,97 \pm 8,83$
Compuesto 4 (5 μ M) + LPS	$22,49 \pm 6,18$

¹Los resultados se representan como media \pm error típico de la media.

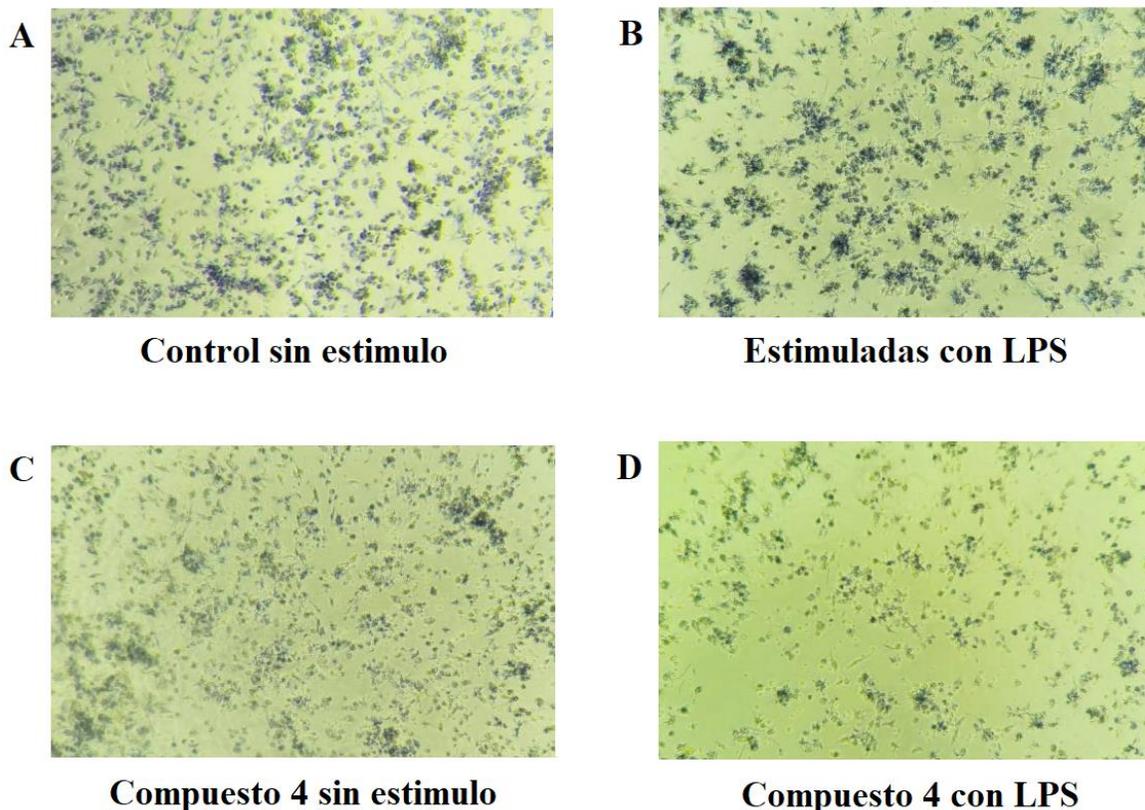


Figura 13. Macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis. En la figura se muestran los macrófagos tras realizar el ensayo de viabilidad por reducción de MTT, produciendo formazano de color púrpura. Se presentan los macrófagos en condiciones basales (A), estimulados con LPS (B), tratados con el compuesto 4 a la concentración 25 μ M sobre macrófagos sin estímulo (C) y con el mismo tratamiento sobre macrófagos estimulados con LPS (D). Microscopio Nikon Eclipse T2 con aumento 10x.

Con respecto a los niveles de citoquinas proinflamatorias producidos por los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis, los niveles de IL-1 β no fueron detectables en 4 de las 5 muestras que se analizaron, mientras que en la quinta no fue posible medir los niveles de citoquinas debido a la falta de suficiente muestra.

El compuesto 4 no pareció afectar los niveles de la citoquina TNF- α producida por los macrófagos estimulados con LPS. A pesar de que los resultados no fueron significativos, hubo una tendencia a la disminución de TNF- α cuando los macrófagos no estimulados fueron tratados con el compuesto 4 (Figura 14A). Por otro lado, se observó un aumento significativo en los niveles de TNF- α cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS con respecto a los sin estímulo, ya sea en condiciones control, o luego del tratamiento con la concentración 20 μ M del compuesto 4 (Figura 14A). Pese a que en la Figura 14A parece haber una tendencia al aumento de TNF- α cuando los macrófagos se trataron con la concentración 5 μ M del

compuesto 4, esto sólo se debe a que el tamaño muestral para dicha concentración fue de $n = 2$, y coincidió con las muestras que produjeron mayores niveles de la citoquina, por lo que a dichas muestras no se les realizó análisis estadístico.

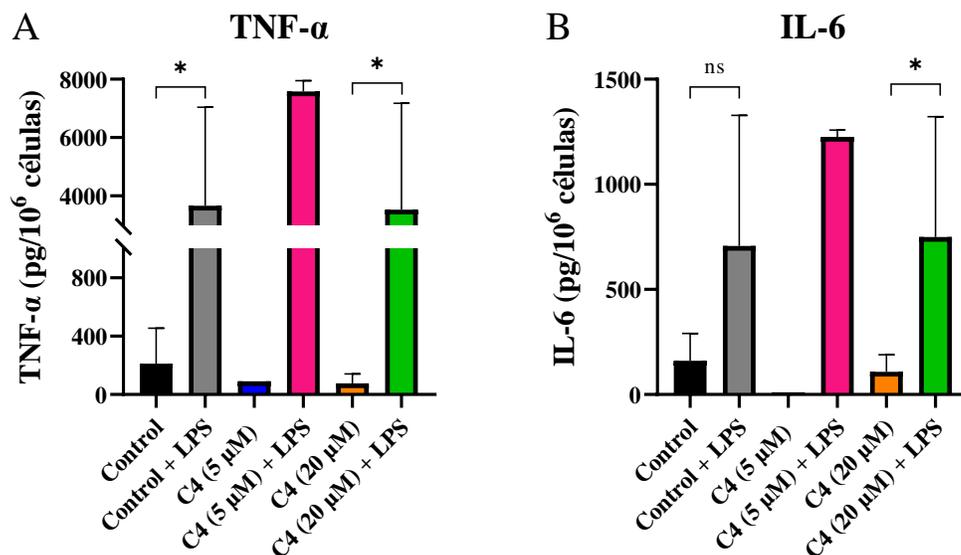


Figura 14. Niveles de citoquinas producidas por macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis. Se representan los niveles de las citoquinas proinflamatorias TNF- α (A) e IL-6 (B) producidos en cultivos primarios de macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis, tratados con dos dosis diferentes del compuesto 4 (C4). En los gráficos se representan las barras y desviaciones, como las medias \pm error típico de la media para un tamaño muestral de $n = 5$ para los resultados de TNF- α , excepto para la concentración 5 μ M del compuesto 4 sobre macrófagos sin estímulo y estimulados con LPS, donde el tamaño muestral fue de $n = 1$ y $n = 2$ respectivamente, al igual que para IL-6. El resto de los resultados para IL-6 tuvo un tamaño muestral de $n = 4$. * = $p < 0,05$; n.s. = sin diferencia significativa (no significativa). Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba de ANOVA de una cola seguido por la prueba T de Student.

Con respecto a IL-6, los resultados fueron similares a los obtenidos para TNF- α , sin embargo, pese a que existió una clara tendencia al aumento en los niveles de IL-6 producida por los macrófagos estimulados con LPS con respecto a los que no recibieron estímulo, este resultado no presentó una diferencia estadísticamente significativa. En cambio, sí hubo una diferencia significativa entre los macrófagos tratados con la concentración 20 μ M del compuesto 4 que fueron estimulados con LPS con respecto a los que no recibieron un estímulo adicional (Figura 14B), al igual que para TNF- α , no se realizó análisis estadístico para la concentración 5 μ M.

Es importante señalar que algunos puntos de las muestras estimuladas con LPS se salieron de curva de estándares, por lo que en los gráficos se muestran los resultados obtenidos al utilizar una proyección de la recta. También se graficaron los resultados obtenidos considerando dichos puntos como la concentración superior detectable por la curva de estándares, los cuales no mostraron diferencias estadísticas con los resultados sin la corrección (Anexo 1).

4.5. Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la serie de compuestos derivados de hidrazonas sobre dos patógenos oportunistas, la bacteria Gram negativa *E. coli* [105] y el hongo diploide *C. albicans* [106]. Para lograr dicho objetivo, se evaluó la viabilidad de los microorganismos tras ser tratados con los compuestos, mediante la medición continuada con intervalos de 1 hora de dichos cultivos durante 24 o 48 horas para *E. coli* y *C. albicans*, respectivamente. En un principio, se utilizó las concentraciones 1, 10 y 25 μM de los compuestos, preparados con las mismas soluciones *stock* utilizadas para el resto de las células (1 mg/mL), usando DMSO como disolvente. Sin embargo, los niveles de DMSO presentes en los cultivos fueron demasiado tóxicos tanto para *E. coli* como *C. albicans*. Debido a esto, para lograr disminuir los niveles de DMSO en los cultivos, se prepararon nuevas disoluciones *stock* más concentradas de los compuestos. Para los compuestos 1-3 y 5-7 se obtuvieron disoluciones de 5 mg/mL, mientras que para el compuesto 4, solo se logró la concentración 2,5 mg/mL. Cabe mencionar que los controles con DMSO se realizaron con las concentraciones más altas presentes en los cultivos, es decir, las mismas que cuando los microorganismos se trataron con el compuesto 4.

Los resultados para *C. albicans* mostraron que el DMSO por sí solo a las concentraciones presentes en los cultivos (entre 55,10 μM o 0,40% y 2,20 μM o 0,02%) no produjo una citotoxicidad importante, y que por el contrario, con la concentración mayor (55,10 μM) estimulaba el crecimiento de *C. albicans*, superando incluso en un 50% el crecimiento con respecto a los cultivos sin tratamiento durante las primeras 10 horas (Figura 15A). Por otro lado, se utilizó como control positivo el tratamiento con el antifúngico Anfotericina B en diferentes concentraciones para comparar con los niveles de citotoxicidad de la serie de hidrazonas ensayada (Figura 15B)

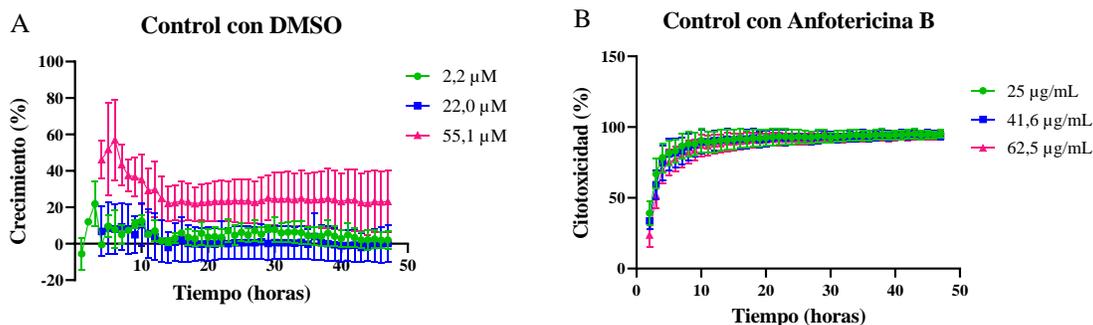


Figura 15. Controles utilizados en el ensayo antifúngico contra *C. albicans*. En el panel A se muestra el comportamiento de *C. albicans* al ser tratada con las concentraciones máximas de DMSO presente en los cultivos, representado como el porcentaje de crecimiento adicional de *C. albicans* con respecto a los cultivos sin tratamiento. En el panel B se presenta la citotoxicidad de la Anfotericina B utilizada como control sobre *C. albicans* con respecto a los cultivos sin tratamiento. Los puntos de los gráficos se representan con sus barras de error como la media \pm error típico de la media para un tamaño muestral de $n = 3$.

Además, todos los compuestos reflejaron resultados negativos de citotoxicidad para *C. albicans*, exceptuando los compuestos 3, 4 y 5, los cuales no tuvieron ningún efecto con las concentraciones 10 y 25 μM, mientras que con la concentración 1 μM también se vieron citotoxicidades negativas (Figura 16). Debido a esto, se volvieron a analizar los datos, pero esta vez determinando el porcentaje de aumento en el crecimiento de *C. albicans* estimulado por los compuestos, con respecto a los cultivos sin tratamiento. Los resultados mostraron que los cultivos tratados con los compuestos 1, 2, 6 y 7 presentaron aproximadamente los mismos niveles de aumento en el crecimiento con todas las concentraciones evaluadas, mientras que los tratados con los compuestos 3, 4 y 5 solo presentaron un aumento en el crecimiento importante (sobre el 40%) con la concentración 1 μM (Figura 17).

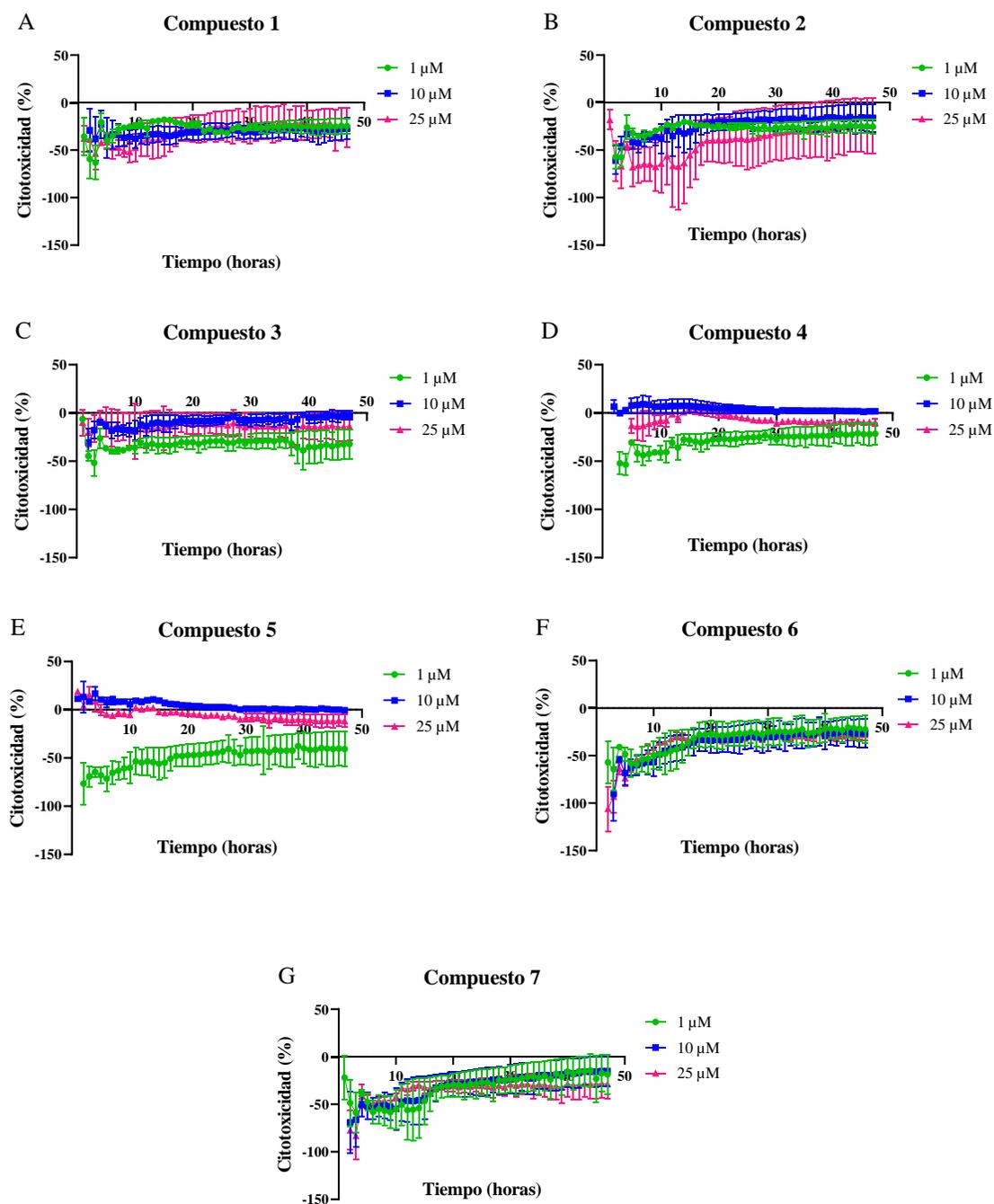


Figura 16. Actividad citotóxica de la serie de hidrazonas frente a *C. albicans*. Se representa la actividad de los compuestos como la citotoxicidad con respecto a *C. albicans* sin tratamiento en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm error típico (barra de error) para un tamaño muestral de $n = 3$. En la figura se muestra la actividad de los compuestos 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F) y 7 (G).

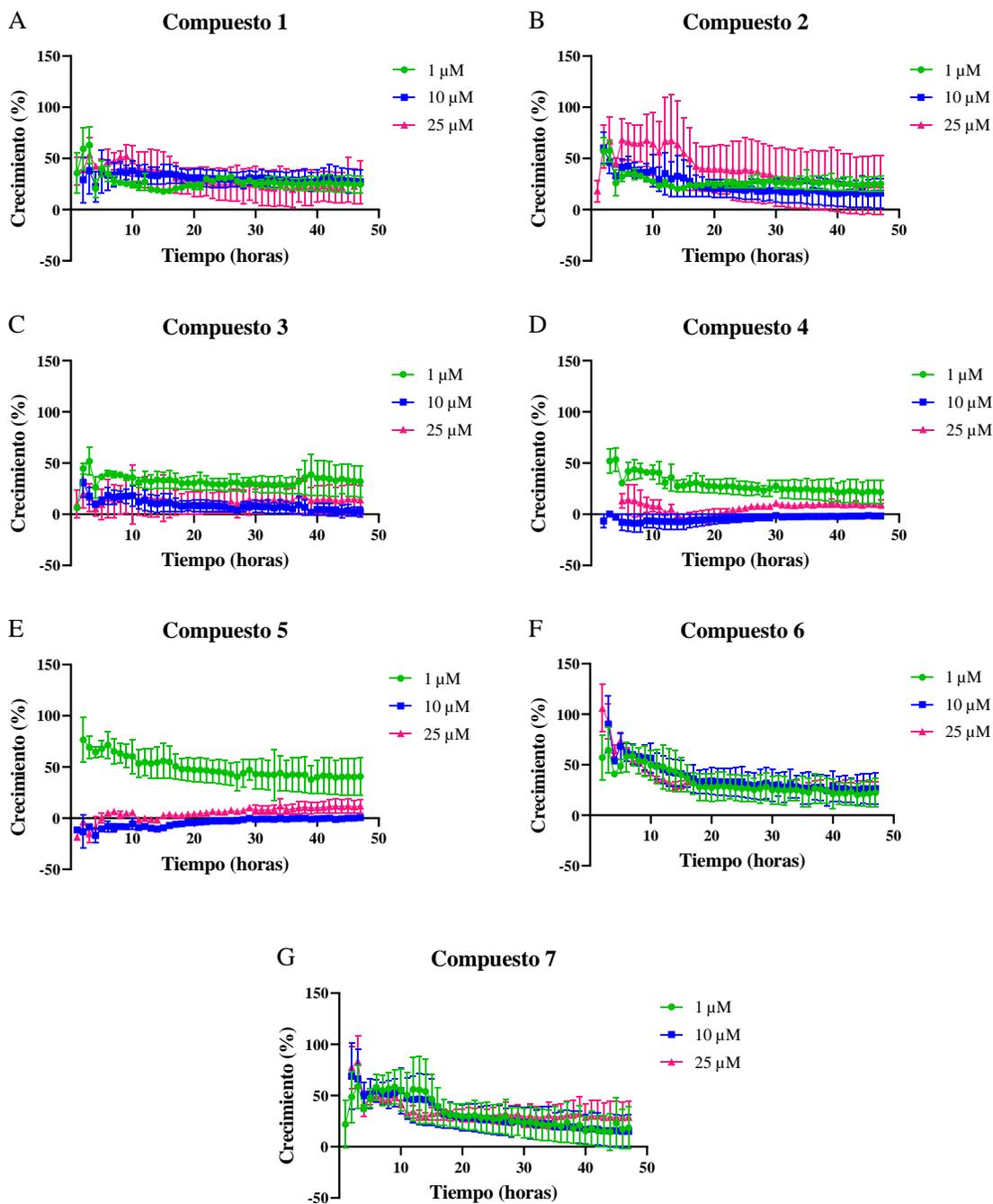


Figura 17. Actividad estimuladora de crecimiento fúngico de la serie de hidrazonas frente a *C. albicans*. Se representa la actividad de los compuestos como el porcentaje de crecimiento adicional de *C. albicans* con respecto a los cultivos sin tratamiento en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm error típico (barra de error) para un tamaño muestral de $n = 3$. En la figura se muestra la actividad de los compuestos 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F) y 7 (G).

Al igual que para *C. albicans*, se evaluó en cada experimento para *E. coli* el efecto del DMSO por sí solo. Los resultados indicaron que las dosis de DMSO presentes en los cultivos (entre 55,1 μM o 0,4% y 2,2 μM o 0,02%) no tuvieron un efecto importante sobre *E. coli* (Figura 18A). Además, como control positivo de citotoxicidad para *E. coli* se utilizó diferentes concentraciones de la mezcla de antibióticos penicilina + estreptomicina (Figura 18B). Por otro lado, los mismos compuestos que estimularon a *C. albicans* (1, 2, 6 y 7) también estimularon el crecimiento de *E. coli* a todas las concentraciones evaluadas, pero en este caso, el aumento en el crecimiento sobre el 40% se presentó luego de las 10 horas de tratamiento. Además, los compuestos 3, 4 y 5 no tuvieron efecto importante en el crecimiento de *E. coli* con las dosis aplicadas (Figura 19 y 20).

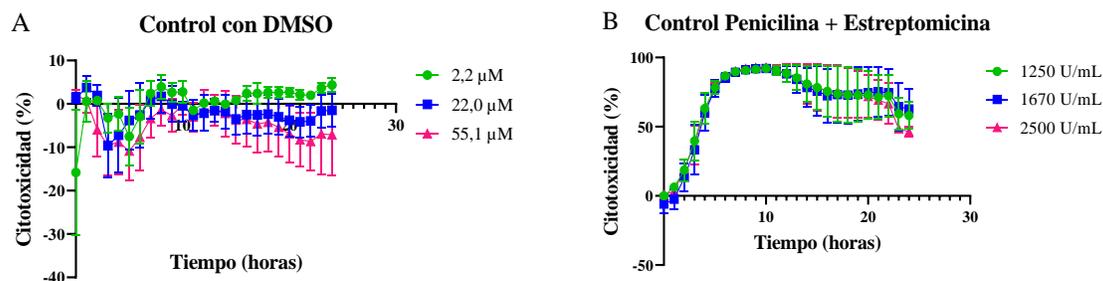


Figura 18. Controles utilizados en el ensayo antibacteriano contra *E. coli*. En el panel A se muestra el comportamiento de *C. albicans* al ser tratada con las concentraciones máximas de DMSO presente en los cultivos. Se grafica la citotoxicidad de la bacteria en función del tiempo. En el panel B se representa la citotoxicidad de la mezcla de antibióticos penicilina + estreptomicina utilizada como control sobre *E. coli*. Cada punto representa la media \pm error típico (barra de error) para un tamaño muestral de $n = 3$.

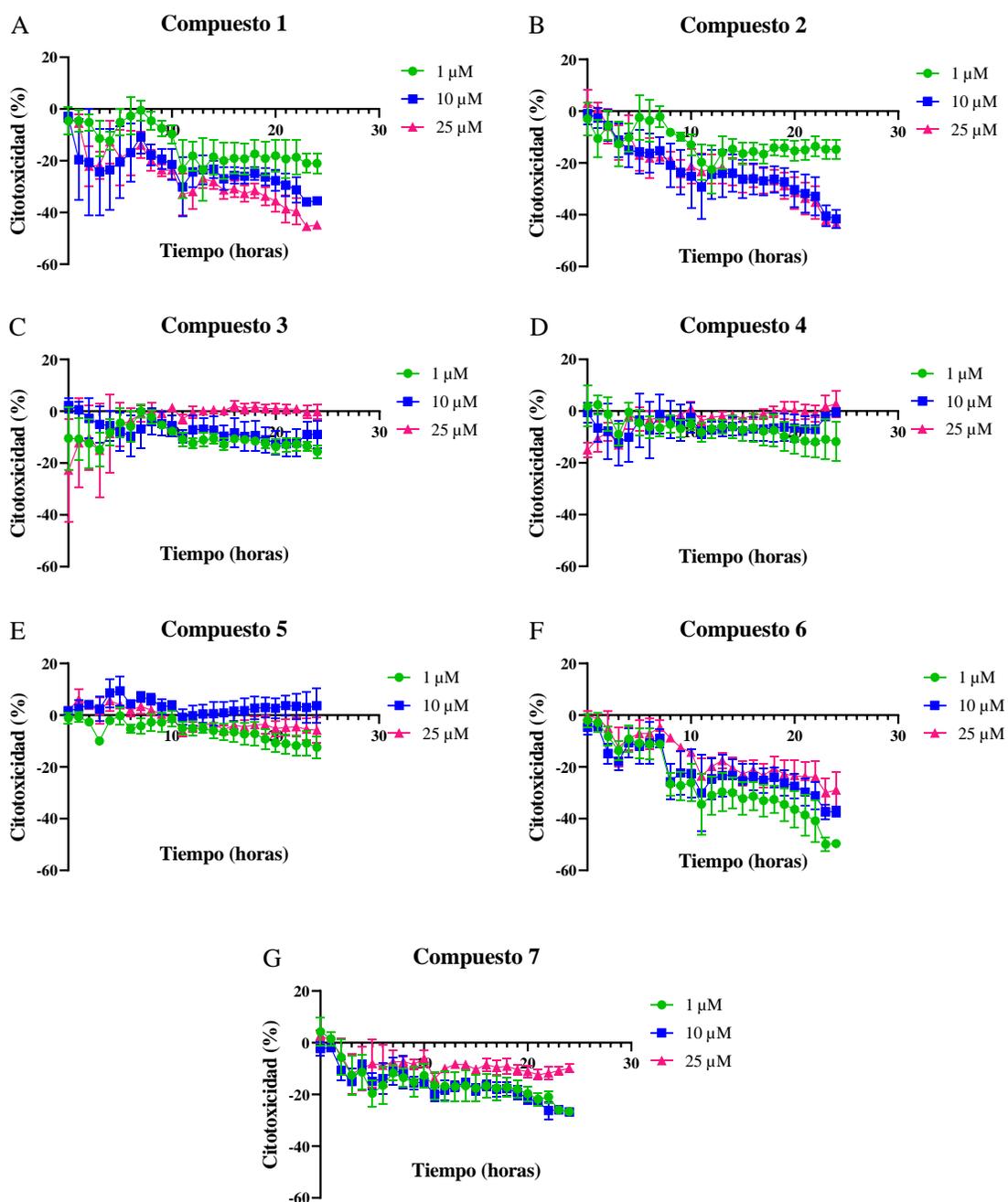


Figura 19. Actividad citotóxica de la serie de hidrazonas frente a *E. coli*. Se representa la actividad de los compuestos como la citotoxicidad en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm error típico (barra de error) para un tamaño muestral de $n = 3$. Se muestra la actividad de los compuestos 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F) y 7 (G).

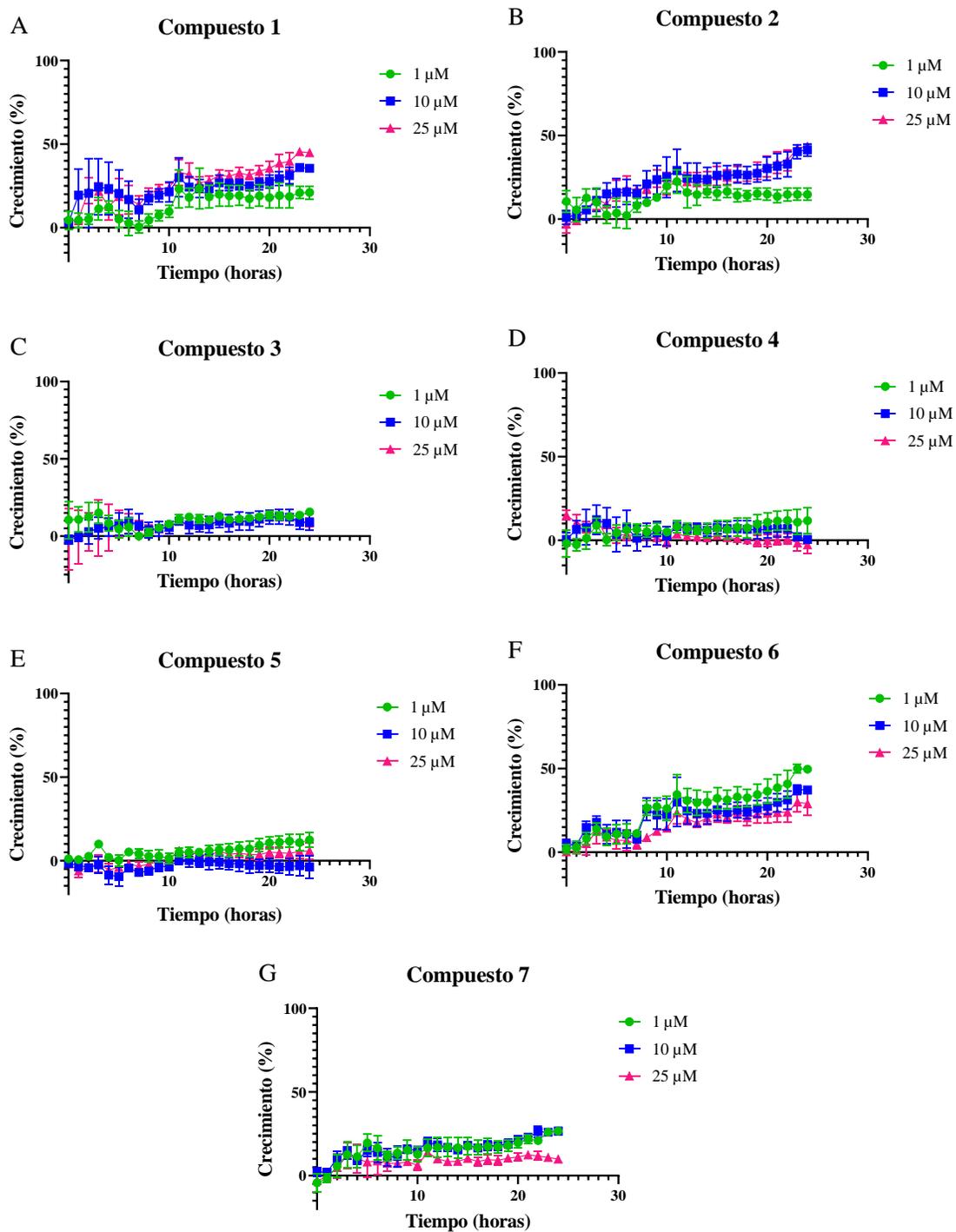


Figura 20. Actividad estimuladora del crecimiento de *E. coli* de la serie de hidrazonas. Se presenta la actividad de los compuestos como el porcentaje de crecimiento adicional de *E. coli* con respecto a los cultivos sin tratamiento en función del tiempo. Cada punto representa la media \pm error típico (barra de error) para un tamaño muestral de $n = 3$. En la figura se muestran la actividad de los compuestos 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D), 5 (E), 6 (F) y 7 (G).

5. Discusión

De la serie de compuestos evaluada, el compuesto 4 exhibió una potente actividad citotóxica sobre las dos líneas celulares utilizadas como modelos tumorales mieloides, siendo más potente contra HL-60 que K562, lo cual no es sorprendente, ya que varios estudios han indicado que K562 presenta una mayor resistencia a nuevos fármacos que HL-60 [107, 108]. Además, se observó que el compuesto 4 solo fue altamente citotóxico sobre células en proliferación activa, mientras que en las células diferenciadas a partir de la línea celular HL-60 presentó una mínima citotoxicidad. Este resultado es interesante, ya que podría indicar que el compuesto 4 actúa sobre las vías de señalización involucradas en la proliferación celular, más que solo tener un efecto tóxico sobre cualquier tipo de células, lo que deja una puerta abierta a la investigación del mecanismo de acción de este nuevo derivado de hidrazona, y las vías de señalización que podría estar afectando. Por otro lado, los otros 6 compuestos de la serie no mostraron una actividad importante que perdurara en el tiempo sobre ninguna de las dos líneas celulares utilizadas.

El compuesto 4 fue capaz de disminuir significativamente los niveles basales de TNF- α producidos por células tipo macrófagos derivados de la línea celular HL-60, con las concentraciones 5 y 10 μ M. Además, los compuestos 1 y 6 disminuyeron significativamente los niveles de IL-1 β en células tipo macrófagos estimuladas con LPS. La mayoría de los compuestos evaluados no mostraron alterar los niveles de citoquinas producidas por las células, y los que presentaron actividad sólo fue sobre una de las tres citoquinas proinflamatorias evaluada. Por lo tanto, la serie de hidrazidas posee baja actividad sobre la modulación de la respuesta inflamatoria en el modelo *in vitro* de células tipo macrófagos derivados de HL-60. Cabe mencionar que solo IL-1 β mostró una diferencia significativa entre los niveles basales y los estimulados por LPS en este modelo celular. La falta de diferencias significativas en los niveles de las otras dos citoquinas estudiadas puede deberse principalmente a que el estímulo con PMA para promover la diferenciación de las células, es tan potente que a pesar de dejar las células descansar luego de la diferenciación, sigue teniendo efectos estimulantes al interior de las células, por lo que el estímulo adicional con LPS podría ser innecesario, o bien se podría aumentar el tiempo de descanso de las células de 24 a 48 horas. Por otro lado, el DMSO por si sólo disminuyó significativamente los niveles de IL-1 β con la concentración más alta utilizada (138 μ M), sin embargo, al igual que en el

caso de los ensayos antitumorales sobre células mieloides, demostró no comportarse de la misma manera estando puro que cuando era utilizado como disolvente para los compuestos, ya que cuando estaba en dicha concentración, pero actuando como disolvente, solo dos de los siete compuestos evaluados presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados para la actividad del compuesto 4 sobre macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis no siguieron el mismo patrón que en el caso de las células tipo macrófagos derivadas de la línea celular HL-60. Se observó que dicho compuesto no afectó la producción de las citoquinas proinflamatorias estudiadas cuando los macrófagos peritoneales humanos en cultivo primario fueron estimulados con LPS. Sin embargo, a pesar de existir una diferencia estadísticamente significativa, se observó una tendencia a la disminución en los niveles de TNF- α e IL-6 cuando los macrófagos no estimulados, es decir en estado basal, se trataron con el compuesto 4, en comparación con los respectivos controles sin tratamiento. A pesar de que el compuesto 4 no presentó una importante actividad antiinflamatoria, este ensayo mostró otros resultados interesantes, ya que se pudo evaluar la respuesta de los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis al estímulo con LPS, reflejando un aumento significativo en sus niveles de TNF- α e IL-6 cuando fueron estimulados con LPS, con respecto a las condiciones basales. Además, a partir de los resultados obtenidos mediante el ensayo de reducción de MTT se pudo deducir que el compuesto 4 afectó al metabolismo mitocondrial de los macrófagos peritoneales, y que, a pesar de esto, no perdieron su capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias. En conjunto, estos hallazgos sugieren que los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis poseen una alta capacidad de respuesta a estímulos proinflamatorios como el LPS. Una de las principales limitaciones de esta parte del trabajo fueron las propias de utilizar muestras humanas, es decir, la disponibilidad de muestras clínicas, ya que no llegaban de manera constante, y además, muchas de ellas no presentaban cantidades útiles de macrófagos peritoneales (muestras acelulares). Debido a esto, las muestras no pudieron agruparse de acuerdo con el estadio de la patología, lo cual constituye una proyección a futuro del estudio, ya que se ha reportado que algunas citoquinas, entre ellas la citoquina proinflamatoria TNF- α medida en este estudio, se encuentran más elevadas en estadios tempranos de la patología [109]. Además, es necesario realizar más ensayos con el compuesto 4 sobre los macrófagos

peritoneales, ya que la tendencia exhibida sobre aquellos macrófagos sin estímulo podría verificarse al realizar más réplicas y separar las muestras por estadios de la patología.

Los ensayos antimicrobianos reflejaron que ningún compuesto presentó actividad antifúngica. Por el contrario, todos ellos e incluso el DMSO por sí solo a la concentración más alta evaluada, estimularon el crecimiento de *C. albicans*, principalmente durante las primeras 10 horas de tratamiento; sin embargo, el compuesto 4 solo estimuló de manera importante el crecimiento del hongo durante las primeras horas con la concentración 1 μ M, al igual que el compuesto 5. El crecimiento se vio reflejado tanto en la gemación como en la formación de hifas. Por otro lado, los ensayos con *E. coli* mostraron que ninguno de los compuestos tuvo actividad antibacteriana, y que al igual que con *C. albicans*, algunos de ellos también estimularon su crecimiento, pero en este caso luego de 10 horas de tratamiento, y de manera menos importante. Por su parte, el compuesto 4 no afectó de ninguna manera el crecimiento de *E. coli*, lo cual es una ventaja teniendo en cuenta que sus posibles aplicaciones serían sobre pacientes propensos a sufrir infecciones oportunistas. El comportamiento inusual de los dos microorganismos evaluados frente al tratamiento con la serie de nuevos compuestos derivados de hidrazonas, se podría deber en el caso de *C. albicans* al estrés que dichos compuestos supondrían para el hongo, lo cual se pudo evidenciar por la formación inusual de hifas durante las primeras 10 horas de tratamiento. En cuanto a *E. coli*, la respuesta es menos clara, ya que al ocurrir pasadas las 10 horas de tratamiento se podría pensar en la generación de resistencia, sin embargo, se requiere un análisis más certero al respecto. Los resultados generales de la citotoxicidad de los compuestos frente a microorganismos oportunistas indicaron que el compuesto 4 no afectó de ninguna manera la proliferación de *E. coli*, pero aumentó el crecimiento de *C. albicans*, debido a esto, a pesar de tener actividad antitumoral sobre líneas celulares mieloides y reducir algunas citoquinas proinflamatorias, se deben hacer más estudios sobre su actividad sobre microorganismos oportunistas.

El DMSO utilizado como disolvente para la serie de compuestos evaluados, resultó ser uno de los principales problemas experimentales en este trabajo, ya que a pesar de que se le han atribuido diversas actividades biológicas siendo el principal compuesto activo [110], en todos los ensayos realizados en este estudio mostró no comportarse de la misma manera estando puro que cuando se utilizó como disolvente. Siendo altamente tóxico sobre las líneas

celulares mieloides en la concentración más alta utilizada (9.8%), lo cual no es extraño, ya que se ha reportado que volúmenes superiores al 10% de DMSO son altamente tóxicos en células animales, ya que forma poros en las membranas plasmáticas [111]. Además, el DMSO tuvo un efecto inesperado ya que estimuló el crecimiento de *C. albicans*, y, a pesar de que se ha informado que volúmenes inferiores al 3% de DMSO son seguras como disolventes para microorganismos [112], fue necesario utilizar volúmenes inferiores al 1% para evitar la citotoxicidad del disolvente sobre *C. albicans* y *E. coli*. A pesar de no existir estudios certeros al respecto, de acuerdo a los resultados obtenidos y la bibliografía disponible [113, 114] se puede deducir que esta diferencia en el comportamiento del DMSO se debe principalmente a que al tratarse de un disolvente aprótico que utiliza la solvatación como mecanismo para solubilizar, a concentraciones altas de compuestos orgánicos tan poco solubles como esta nueva serie de derivados de hidrazonas, sus moléculas se saturarían y no estarían disponibles para ejercer los efectos tóxicos que se han descrito sobre las membranas plasmáticas de las células. Por todo lo antes mencionado, es necesario buscar nuevos métodos de administración de los compuestos, ya sean otros disolventes orgánicos con menor toxicidad como el etanol o metanol [115], o bien utilizar otras técnicas de entrega como el uso de vesículas. Además, en el caso particular de este trabajo, se podrían comprobar los resultados obtenidos para los ensayos sobre líneas celulares utilizando concentraciones menores de DMSO como se hizo para los microorganismos.

La importancia principal de este trabajo radica en la búsqueda de nuevos compuestos activos para el desarrollo de fármacos más eficaces y con menos efectos adversos que los que se encuentran actualmente en el mercado. Ya que, a pesar de que el área del cáncer está en constante investigación, los nuevos hallazgos solo han logrado reducir la mortalidad de la patología sin encontrar un tratamiento de erradicación efectiva [116, 117]. Por otro lado, los tratamientos para enfermedades inflamatorias son otro de los grandes problemas de salud pública en el mundo, ya que aunque existen diversos fármacos con este propósito, todos ellos producen efectos secundarios insostenibles en tiempo debido a su baja selectividad sobre sus moléculas blanco, por lo que se han desarrollado nuevos tratamientos basados en la inhibición selectiva de COX-2, sin embargo, dichos fármacos también han mostrado efectos adversos, principalmente a nivel renal [24-26]. Cabe mencionar que existen diversos grupos que han estudiado tanto la actividad antitumoral como la antiinflamatorias de diferentes

derivados de hidrazidas-hidrazonas, sin embargo, ninguno de estos estudios ha llegado más allá en sus estudios que el uso de modelos animales [12-17, 27-34].

En este trabajo también se asocia la actividad antiinflamatoria de los derivados de hidrazonas con la posible actividad que estos podrían tener sobre macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis. Esto, debido a que existen diversos hallazgos que señalan a este tipo de inmunocitos como uno de los principales responsables de la etiología y mantenimiento de la endometriosis [78-80]. Sin embargo, siguen sin existir tratamientos para esta patología que no se enfoquen solamente en la supresión hormonal o escisión de las lesiones, por lo que resulta atractivo utilizar los macrófagos peritoneales como blancos terapéuticos para el tratamiento de la endometriosis. Por otro lado, debido la dificultad para obtener muestras peritoneales de mujeres con esta patología, dichos macrófagos siguen sin ser caracterizados totalmente, pero a pesar de estas limitantes, en este trabajo se logró evaluar el comportamiento de estas células frente a diferentes estímulos.

6. Conclusiones

En este trabajo se planteó como objetivo general evaluar las actividades biológicas de una nueva serie de compuestos derivados de hidrazonas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que, de la serie de compuestos evaluados, solo el compuesto 4 logró una actividad antitumoral importante sobre células de origen mieloide, la cual mostró ser selectiva sobre células en proliferación activa, ya que presentó una mínima citotoxicidad sobre células diferenciadas a partir de la línea celular HL-60 y cultivos primarios de macrófagos peritoneales. Además, dicho compuesto disminuyó significativamente los niveles basales de la citoquina proinflamatoria TNF- α producida por células tipo macrófagos derivados de la línea celular HL-60. Los compuestos 1 y 6 disminuyeron significativamente los niveles de IL- β en el mismo modelo celular. Por otro lado, ninguno de los compuestos mostró actividad antimicrobiana en los dos modelos estudiados, e incluso, algunos de ellos estimularon el crecimiento bacteriano y fúngico.

Como conclusión general de la actividad del compuesto 4 en los distintos modelos *in vitro* utilizados, se demostró que dicho compuesto posee actividad antiproliferativa sobre modelos tumorales celulares, sin afectar considerablemente a las células en estado diferenciado terminar, ni a patógenos oportunistas. Y además, fue capaz de reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias producidas por células tipo macrófagos derivados de la línea celular HL-60.

En cuanto a los macrófagos peritoneales de mujeres con endometriosis, se pudo concluir que este tipo celular posee una robusta respuesta al estímulo por LPS, llegando a niveles de producción de citoquinas inalterables con el tratamiento de otro tipo de compuestos.

7. Referencias

1. Chemistry I. IUPAC Gold Book - hydrazides. Goldbook.iupac.org. 2018 [cited 18 October 2018]. <https://goldbook.iupac.org/html/H/H02879.html>.
2. Bala, S., Uppal, G., Kajal, A., Kamboj, S., & Sharma, V. (2013). Hydrazones as promising lead with diversity in bioactivity-therapeutic potential in present scenario. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 18(1), 65-74.
3. Popiołek, Ł., Biernasiuk, A., & Malm, A. (2015). Synthesis and antimicrobial activity of new 1, 3-thiazolidin-4-one derivatives obtained from carboxylic acid hydrazides. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 190(2), 251-260.
4. Popiołek, Ł. (2017). Hydrazone-hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Medicinal Chemistry Research*, 26(2), 287-301.
5. Maia, R. D. C., Tesch, R., & Fraga, C. A. M. (2014). Acylhydrazone derivatives: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(11), 1161-1170.
6. McCalla, D. R., Reuvers, A., & Kaiser, C. (1970). Mode of action of nitrofurazone. *Journal of Bacteriology*, 104(3), 1126-1134.
7. Ali, B. H. (1983). Some pharmacological and toxicological properties of furazolidone. *Veterinary Research Communications*, 6(1), 1-11.
8. Munoz-Davila, M. J. (2014). Role of old antibiotics in the era of antibiotic resistance. Highlighted nitrofurantoin for the treatment of lower urinary tract infections. *Antibiotics*, 3(1), 39-48.
9. Gomez, A. (2018). OPS/OMS| Programa de Cáncer. Recuperado 20 de julio de 2019, de Pan American Health Organization. *World Health Organization website: https://www.paho.org/hq/index.php*.
10. Stewart, B. W., Bray, F., Forman, D., Ohgaki, H., Straif, K., Ullrich, A., & Wild, C. P. (2015). Cancer prevention as part of precision medicine: 'plenty to be done'. *Carcinogenesis*, 37(1), 2-9.
11. Vitetta, E. S., Krolick, K. A., Miyama-Inaba, M., Cushley, W., & Uhr, J. W. (2019). Immunotoxins: a new approach to cancer therapy. In *Biotechnology and Biological Frontiers* (pp. 73-85). Routledge.
12. Sreenivasulu, R., Reddy, K. T., Sujitha, P., Kumar, C. G., & Raju, R. R. (2019). Synthesis, antiproliferative and apoptosis induction potential activities of novel bis

- (indolyl) hydrazide-hydrazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(6), 1043-1055.
13. Mohareb, R. M., & Al-Omran, F. (2012). Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: novel synthesis of hydrazide–hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids*, 77(14), 1551-1559.
 14. Vogel, S., Kaufmann, D., Pojarová, M., Müller, C., Pfaller, T., Kühne, S., Bednarski, P. J. & von Angerer, E. (2008). Aroyl hydrazones of 2-phenylindole-3-carbaldehydes as novel antimitotic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(12), 6436-6447.
 15. Cui, Z., Li, Y., Ling, Y., Huang, J., Cui, J., Wang, R., & Yang, X. (2010). New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 5576-5584.
 16. Cihan-Üstündağ, G., Şatana, D., Özhan, G., & Çapan, G. (2016). Indole-based hydrazide-hydrazones and 4-thiazolidinones: synthesis and evaluation as antitubercular and anticancer agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 369-380.
 17. Han, M. İ., Bekçi, H., Uba, A. I., Yıldırım, Y., Karasulu, E., Cumaoğlu, A., Karasulu, H. Y., Yelekçi, K., Yılmaz, Ö. & Küçükgülzel, Ş. G. (2019). Synthesis, molecular modeling, in vivo study, and anticancer activity of 1, 2, 4-triazole containing hydrazide–hydrazones derived from (S)-naproxen. *Archiv der Pharmazie*, e1800365.
 18. Dandawate, P., Khan, E., Padhye, S., Gaba, H., Sinha, S., Deshpande, J., Swamy, K. V., Khetmalas, M., Ahmad, A. & Sarkar, F. H. (2012). Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(9), 3104-3108.
 19. Al-Said, M. S., Bashandy, M. S., Al-Qasoumi, S. I., & Ghorab, M. M. (2011). Anti-breast cancer activity of some novel 1, 2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(1), 137-141.
 20. Germain, A. R., Carmody, L. C., Morgan, B., Fernandez, C., Forbeck, E., Lewis, T. A., Perez, J. R. & Muñoz, B. (2012). Identification of a selective small molecule inhibitor of breast cancer stem cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(10), 3571-3574.

21. Wolfe, M. M., Lichtenstein, D. R., & Singh, G. (1999). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *New England Journal of Medicine*, *340*(24), 1888-1899.
22. Zarghi, A., & Arfaei, S. (2011). Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *10*(4), 655.
23. Koopaei, M. N., Assarzadeh, M. J., Almasirad, A., Ghasemi-Niri, S. F., Amini, M., Kebriaeezadeh, A., Koopaeib, N. N., Ghadimia, M. & Tabei, A. (2013). Synthesis and analgesic activity of novel hydrazide and hydrazine derivatives. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, *12*(4), 721.
24. Dannhardt, G., & Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase inhibitors—current status and future prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *36*(2), 109-126.
25. Kiefer, W., & Dannhardt, G. (2005). Cox-2 inhibition and pain management: a review summary. *Expert review of Clinical Immunology*, *1*(3), 431-442.
26. Rudic, R. D., Brinster, D., Cheng, Y., Fries, S., Song, W. L., Austin, S., Coffman, T. M. & FitzGerald, G. A. (2005). COX-2-derived prostacyclin modulates vascular remodeling. *Circulation Research*, *96*(12), 1240-1247.
27. Salgın-Gökşen, U., Gökhan-Kelekçi, N., Göktaş, Ö., Köysal, Y., Kılıç, E., Işık, Ş., Aktay, G. & Özalp, M. (2007). 1-Acylthiosemicarbazides, 1, 2, 4-triazole-5 (4H)-thiones, 1, 3, 4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *15*(17), 5738-5751.
28. Mohammed, K. O., & Nissan, Y. M. (2014). Synthesis, Molecular Docking, and Biological Evaluation of Some Novel Hydrazones and Pyrazole Derivatives as Anti-inflammatory Agents. *Chemical Biology & Drug Design*, *84*(4), 473-488.
29. Avila, C. M., Lopes, A. B., Gonçalves, A. S., da Silva, L. L., Romeiro, N. C., Miranda, A. L. P., Sant Ana, C. M. R., Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. (2011). Structure-based design and biological profile of (E)-N-(4-Nitrobenzylidene)-2-naphthohydrazide, a novel small molecule inhibitor of I κ B kinase- β . *European Journal of Medicinal Chemistry*, *46*(4), 1245-1253.

30. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388(6642), 548.
31. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Wu Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. & Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, 278(5339), 860-866.
32. Kümmerle, A. E., Vieira, M. M., Schmitt, M., Miranda, A. L., Fraga, C. A., Bourguignon, J. J., & Barreiro, E. J. (2009). Design, synthesis and analgesic properties of novel conformationally-restricted N-acylhydrazones (NAH). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(17), 4963-4966.
33. Murineddu, G., Loriga, G., Gavini, E., Peana, A. T., Mulè, A. C., & Pinna, G. A. (2001). Synthesis and analgesic-antiinflammatory activities of novel acylarylhydrazones with a 5-phenyl-4-R-3-pyrrolyl-acyl moiety. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*, 334(12), 393-398.
34. Bhandari, S. V., Bothara, K. G., Raut, M. K., Patil, A. A., Sarkate, A. P., & Mokale, V. J. (2008). Design, synthesis and evaluation of antiinflammatory, analgesic and ulcerogenicity studies of novel S-substituted phenacyl-1, 3, 4-oxadiazole-2-thiol and Schiff bases of diclofenac acid as nonulcerogenic derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(4), 1822-1831.
35. Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12s), S122.
36. Lewis, R. E. (2011, August). Current concepts in antifungal pharmacology. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 86, No. 8, pp. 805-817). Elsevier.
37. Xu, Z. Q., Flavin, M. T., & Flavin, J. (2014). Combating multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Expert opinion on investigational drugs*, 23(2), 163-182.
38. World Health Organization. (2013). *Global Tuberculosis Report 2013*. World Health Organization.
39. Özkay, Y., Tunalı, Y., Karaca, H., & Işıkdag, İ. (2010). Antimicrobial activity and a SAR study of some novel benzimidazole derivatives bearing hydrazone moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(8), 3293-3298.

40. Yinghong, W., Lu, Y., & Zhichang, L. (2013). Synthesis and antibacterial activity of 5-(2-Hydroxyphenyl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl-sulfanyl acetyl hydrazones. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 33(1), 154-158.
41. Morjan, R. Y., Mkadmh, A. M., Beadham, I., Elmanama, A. A., Mattar, M. R., Raftery, J., Pritchard, R. G., Awadallah, A. M. & Gardiner, J. M. (2014). Antibacterial activities of novel nicotinic acid hydrazides and their conversion into N-acetyl-1, 3, 4-oxadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(24), 5796-5800.
42. Popiołek, Ł., & Biernasiuk, A. (2016). Design, synthesis, and in vitro antimicrobial activity of hydrazide–hydrazones of 2-substituted acetic acid. *Chemical Biology & Drug Design*, 88(6), 873-883.
43. Popiołek, Ł., & Biernasiuk, A. (2017). Synthesis and investigation of antimicrobial activities of nitrofurazone analogues containing hydrazide-hydrazone moiety. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(7), 1097-1102.
44. Rasras, A. J., Al-Tel, T. H., Al-Aboudi, A. F., & Al-Qawasmeh, R. A. (2010). Synthesis and antimicrobial activity of cholic acid hydrazone analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(6), 2307-2313.
45. Kamal, A., Ahmed, S. K., Reddy, K. S., Khan, M. N. A., Shetty, R. V., Siddhardha, B., Murthy, U. S., Khan, I. A., Kumar, M., Sharma, S. & Ram, A. B. (2007). Anti-tubercular agents. Part IV: Synthesis and antimycobacterial evaluation of nitroheterocyclic-based 1, 2, 4-benzothiadiazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(19), 5419-5422.
46. Raja, A., K Agarwal, A., Mahajan, N., N Pandeya, S., & Ananthan, S. (2010). Antibacterial and antitubercular activities of some diphenyl hydrazones and semicarbazones. *NISCAIR-CSIR*.
47. Gemma, S., Savini, L., Altarelli, M., Tripaldi, P., Chiasserini, L., Coccone, S. S., Kumar, V., Camodeca, C., Campiani, G., Novellino, E., Clarizio, S., Delogu, G. & Butini, S. (2009). Development of antitubercular compounds based on a 4-quinolyllhydrazone scaffold. Further structure–activity relationship studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(16), 6063-6072.
48. Velezheva, V., Brennan, P., Ivanov, P., Kornienko, A., Lyubimov, S., Kazarian, K., Nikonenko, B., Majorov, K. & Apt, A. (2016). Synthesis and antituberculosis activity of

- indole–pyridine derived hydrazides, hydrazide–hydrazones, and thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(3), 978-985.
49. Maccari, R., Ottana, R., Monforte, F., & Vigorita, M. G. (2002). In vitro antimycobacterial activities of 2'-monosubstituted isonicotinohydrazides and their cyanoborane adducts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 294-299.
50. Coelho, T. S., Cantos, J. B., Bispo, M. L., Gonçalves, R. S., Lima, C. H., Da Silva, P. E., & Souza, M. V. (2012). In vitro anti-mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives against isoniazid-resistant strains. *Infectious Disease Reports*, 4(1).
51. John, S. F., Aniemeke, E., Ha, N. P., Chong, C. R., Gu, P., Zhou, J., Zhang, Y., Graviss, E. A., Liu, J. O. & Olaleye, O. A. (2016). Characterization of 2-hydroxy-1-naphthaldehyde isonicotinoyl hydrazone as a novel inhibitor of methionine aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 101, S73-S77.
52. Shirinzadeh, H., Altanlar, N., Yucel, N., Ozden, S., & Suzen, S. (2011). Antimicrobial evaluation of indole-containing hydrazone derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 66(7-8), 340-344.
53. Rutkauskas, K., Mickevičius, V., Kantminiene, K., Stasevych, M., Komarovska-Porokhnyavets, O., Musyanovych, R., & Novikov, V. (2013). Synthesis and antimicrobial activity of 1, 3-disubstituted pyrrolidinones with hydrazone and naphthoquinone moieties. *Chemija*, 24(1), 74-80.
54. Secci, D., Bizzarri, B., Bolasco, A., Carradori, S., D'Ascenzio, M., Rivanera, D., Mari, E., Polletta, L. & Zicari, A. (2012). Synthesis, anti-Candida activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl) thiazol-2-yl) hydrazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 246-253.
55. Maillard, L. T., Bertout, S., Quinonéro, O., Akalin, G., Turan-Zitouni, G., Fulcrand, P., Demirci, F., Martínez, J. & Masurier, N. (2013). Synthesis and anti-Candida activity of novel 2-hydrazino-1, 3-thiazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(6), 1803-1807.
56. Altıntop, M. D., Özdemir, A., Turan-Zitouni, G., Ilgın, S., Atlı, Ö., İşcan, G., & Kaplancıklı, Z. A. (2012). Synthesis and biological evaluation of some hydrazone

- derivatives as new anticandidal and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 299-307.
57. Angelova, V., Karabeliov, V., Andreeva-Gateva, P. A., & Tchekalarova, J. (2016). Recent developments of hydrazide/hydrazone derivatives and their analogs as anticonvulsant agents in animal models. *Drug Development Research*, 77(7), 379-392.
58. Agrawal, S., Jain, J., Kumar, A., Gupta, P., & Garg, V. (2014). Synthesis molecular modeling and anticonvulsant activity of some hydrazone, semicarbazone, and thiosemicarbazone derivatives of benzylidene camphor. *Res Rep Med Chem*, 4, 47e58.
59. Dimmock, J. R., Vashishtha, S. C., & Stables, J. P. (2000). Anticonvulsant properties of various acetylhydrazones, oxamoylhydrazones and semicarbazones derived from aromatic and unsaturated carbonyl compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35(2), 241-248.
60. Amir, M., Ali, I., Hassan, M. Z., & Mulakayala, N. (2014). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Hydrazone Incorporated 1, 2, 4-Triazines as Anticonvulsant Agents. *Archiv der Pharmazie*, 347(12), 958-968.
61. Kumar, P., Shrivastava, B., Pandeya, S. N., Tripathi, L., & Stables, J. P. (2012). Design, synthesis, and anticonvulsant evaluation of some novel 1, 3 benzothiazol-2-yl hydrazones/acetohydrazones. *Medicinal Chemistry Research*, 21(9), 2428-2442.
62. Bi, W., Cai, J., Liu, S., Baudy-Floc'h, M., & Bi, L. (2007). Design, Synthesis and cardioprotective effect of a new class of dual-acting agents: Phenolic tetrahydro- β -carboline RGD peptidomimetic conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(22), 6909-6919.
63. Leal, C. M., Pereira, S. L., Kümmerle, A. E., Leal, D. M., Tesch, R., de Sant'Anna, C. M., & Zapata-Sudo, G. (2012). Antihypertensive profile of 2-thienyl-3, 4-methylenedioxybenzoylhydrazone is mediated by activation of the A2A adenosine receptor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 49-57.
64. Lima, L. M., Frattani, F. S., dos Santos, J. L., Castro, H. C., Fraga, C. A. M., Zingali, R. B., & Barreiro, E. J. (2008). Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43(2), 348-356.

65. Tian, B., He, M., Tang, S., Hewlett, I., Tan, Z., Li, J., Jin, Y. & Yang, M. (2009). Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *19*(8), 2162-2167.
66. Gerpe, A., Álvarez, G., Benítez, D., Boiani, L., Quiroga, M., Hernández, P., Sortino, M., Zacchino, S., González, M. & Cerecetto, H. (2009). 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-Trypanosoma cruzi activity and ability to accumulate squalene. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *17*(21), 7500-7509.
67. Caputto, M. E., Fabian, L. E., Benítez, D., Merlino, A., Ríos, N., Cerecetto, H., Moltrasio, G. Y., Moglioni, A. G., González, M. & Finkielstein, L. M. (2011). Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-Trypanosoma cruzi agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *19*(22), 6818-6826.
68. Carvalho, S. A., Feitosa, L. O., Soares, M., Costa, T. E., Henriques, M. G., Salomão, K., Wardell, S. M. & Fraga, C. A. M. (2012). Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *54*, 512-521.
69. de Aquino, T. M., Liesen, A. P., da Silva, R. E., Lima, V. T., Carvalho, C. S., de Faria, A. R., de Araújo, J. M., de Lima, J. G., Alves, A. J., de Melo, E. J. T. & Góes, A. J. (2008). Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene) hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*(1), 446-456.
70. Szuster-Ciesielska, A., Sztanke, K., & Kandfer-Szerszeń, M. (2012). A novel fused 1, 2, 4-triazine aryl derivative as antioxidant and nonselective antagonist of adenosine A2A receptors in ethanol-activated liver stellate cells. *Chemico-biological Interactions*, *195*(1), 18-24.
71. Sztanke, M., & Sztanke, K. (2017). Biologically important hydrazide-containing fused azaisocytosines as antioxidant agents. *Redox Report*, *22*(6), 572-581.
72. Avila, I., Filogônio, I. D. S., Costa, L. M. P., & Carneiro, M. M. (2016). Anatomical distribution of deep infiltrating endometriosis and its relationship to pelvic pain. *Journal of Gynecologic Surgery*, *32*(2), 99-103.
73. Kobayashi, H., Sumimoto, K., Moniwa, N., Imai, M., Takakura, K., Kuromaki, T., E. Morioka, K. Arisawa & Terao, T. (2007). Risk of developing ovarian cancer among

- women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 17(1), 37-43.
74. Jensen, A. L., Collins, J., Shipman, E. P., Wira, C. R., Guyre, P. M., & Pioli, P. A. (2012). A subset of human uterine endometrial macrophages is alternatively activated. *American Journal of Reproductive Immunology*, 68(5), 374-386.
75. Sampson, J. A. (1940). The development of the implantation theory for the origin of peritoneal endometriosis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 40(4), 549-557.
76. Halme, J., Hammond, M. G., Hulka, J. F., Raj, S. G., & Talbert, L. M. (1984). Retrograde menstruation in healthy women and in patients with EM. *Obstetrics and Gynecology*, 64(2), 151-154.
77. García-Penarrubia, P., Ruíz-Alcaraz, A. J., Martínez-Esparza, M., Marín, P. & Machado-Linde, F. (2019). Hypothetical roadmap towards endometriosis: Prenatal endocrine-disrupting chemical pollutants exposure, anogenital distance, gut-genital microbiota and subclinical infections. *Human Reproduction Update*.
78. Králíčková, M., Fiala, L., Losan, P., Tomes, P., & Vetricka, V. (2018). Altered Immunity in Endometriosis: What Came First? *Immunological investigations*, 47(6), 569-582.
79. Khan, K. N., Kitajima, M., Hiraki, K., Fujishita, A., Sekine, I., Ishimaru, T., & Masuzaki, H. (2008). Immunopathogenesis of pelvic EM: role of hepatocyte growth factor, macrophages and ovarian steroids. *American Journal of Reproductive Immunology*, 60(5), 383-404.
80. Hill, J. A., Faris, H. M., Schiff, I., & Anderson, D. J. (1988). Characterization of leukocyte subpopulations in the peritoneal fluid of women with endometriosis. *Fertility and Sterility*, 50(2), 216-222.
81. Capobianco, A., & Rovere Querini, P. (2013). Endometriosis, a disease of the macrophage. *Frontiers in Immunology*, 4, 9.
82. Nie, M. F., Xie, Q., Wu, Y. H., He, H., Zou, L. J., She, X. L., & Wu, X. Q. (2018). Serum and Ectopic Endometrium from Women with Endometriosis Modulate Macrophage M1/M2 Polarization via the Smad2/Smad3 Pathway. *Journal of Immunology Research*, 2018.

83. Brown, B. N., Ratner, B. D., Goodman, S. B., Amar, S., & Badylak, S. F. (2012). Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*, *33*(15), 3792-3802.
84. Chen, P., & Bonaldo, P. (2013). Role of macrophage polarization in tumor angiogenesis and vessel normalization: implications for new anticancer therapies. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 301, pp. 1-35). Academic Press.
85. Laskin, D. L., Sunil, V. R., Gardner, C. R., & Laskin, J. D. (2011). Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *51*, 267-288.
86. Ferrante, C. J., & Leibovich, S. J. (2012). Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Advances in Wound Care*, *1*(1), 10-16.
87. Franco, R., & Fernandez-Suarez, D. (2015). Alternatively activated microglia and macrophages in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *131*, 65-86.
88. Kaldensjö, T., Petersson, P., Tolf, A., Morgan, G., Broliden, K., & Hirbod, T. (2011). Detection of intraepithelial and stromal Langerin and CCR5 positive cells in the human endometrium: potential targets for HIV infection. *PloS One*, *6*(6), e21344.
89. Givan, A. L., White, H. D., Stern, J. E., Colby, E., Guyre, P. M., Wira, C. R., & Gosselin, E. J. (1997). Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Journal of Reproductive Immunology*, *38*(5), 350-359.
90. Starkey, P. M., Clover, L. M., & Rees, M. C. P. (1991). Variation during the menstrual cycle of immune cell populations in human endometrium. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *39*(3), 203-207.
91. Ning, F., Liu, H., & Lash, G. E. (2016). The role of decidual macrophages during normal and pathological pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology*, *75*(3), 298-309.
92. Xie, Q., He, H., Wu, Y. H., Zou, L. J., She, X. L., Xia, X. M., & Wu, X. Q. (2019). Eutopic endometrium from patients with endometriosis modulates the expression of CD36 and SIRP- α in peritoneal macrophages. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *45*(5), 1045-1057.

93. de Villiers, W. J., Fraser, I. P., & Gordon, S. (1994). Cytokine and growth factor regulation of macrophage scavenger receptor expression and function. *Immunology Letters*, 43(1-2), 73-79.
94. Burns, K. A., Thomas, S. Y., Hamilton, K. J., Young, S. L., Cook, D. N., & Korach, K. S. (2017). Early endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor α and IL-6 cross-talk. *Endocrinology*, 159(1), 103-118.
95. Rier, S. E., Zarmakoupis, P. N., Hu, X., & Becker, J. L. (1995). Dysregulation of interleukin-6 responses in ectopic endometrial stromal cells: correlation with decreased soluble receptor levels in peritoneal fluid of women with endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(4), 1431-1437.
96. Suen, J. L., Chang, Y., Chiu, P. R., Hsieh, T. H., Hsi, E., Chen, Y. C., Chen, Y.F. & Tsai, E. M. (2014). Serum level of IL-10 is increased in patients with endometriosis, and IL-10 promotes the growth of lesions in a murine model. *The American Journal of Pathology*, 184(2), 464-471.
97. Quattrone, F., Sanchez, A. M., Pannese, M., Hemmerle, T., Vigano, P., Candiani, M., Patraglia, F., Neri, D. & Panina-Bordignon, P. (2015). The targeted delivery of interleukin 4 inhibits development of endometriotic lesions in a mouse model. *Reproductive Sciences*, 22(9), 1143-1152.
98. Schwager, K., Bootz, F., Imesch, P., Kaspar, M., Trachsel, E., & Neri, D. (2011). The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-10 inhibits endometriosis in a syngeneic mouse model. *Human Reproduction*, 26(9), 2344-2352.
99. Kalu, E., Sumar, N., Giannopoulos, T., Patel, P., Croucher, C., Sherriff, E., & Bansal, A. (2007). Cytokine profiles in serum and peritoneal fluid from infertile women with and without endometriosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 33(4), 490-495.
100. Tarokh, M., Ghaffari Novin, M., Poordast, T., Tavana, Z., Nazarian, H., Norouzian, M., & Gharesi-Fard, B. (2019). Serum and Peritoneal Fluid Cytokine Profiles in Infertile Women with Endometriosis. *Iranian Journal of Immunology*, 16(2), 151-162.
101. Pizzo, A., Salmeri, F. M., Ardita, F. V., Sofo, V., Tripepi, M., & Marsico, S. (2002). Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 54(2), 82-87.

102. Sikora, J., Smycz-Kubańska, M., Mielczarek-Palacz, A., Bednarek, I., & Kondera-Anasz, Z. (2018). The involvement of multifunctional TGF- β and related cytokines in pathogenesis of endometriosis. *Immunology Letters*, *201*, 31-37.
103. Volpato, L. K., Horewicz, V. V., Bobinski, F., Martins, D. F., & Piovezan, A. P. (2018). Annexin A1, FPR2/ALX, and inflammatory cytokine expression in peritoneal endometriosis. *Journal of Reproductive Immunology*, *129*, 30-35.
104. Sikora, J., Mielczarek-Palacz, A., & Kondera-Anasz, Z. (2016). Association of the precursor of interleukin-1 β and peritoneal inflammation—role in pathogenesis of endometriosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *30*(6), 831-837.
105. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *29*(11), 996-1011.
106. Coniel Linares, E., Acosta Núñez, N., Linares Guerra, M., & Alcalde Pérez, J. C. (2010). Infecciones oportunistas de origen bacteriano más frecuentes en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, *14*(1), 72-78.
107. Boozari, M., Mohammadi, A., Asili, J., Emami, S. A., & Tayarani-Najaran, Z. (2015). Growth inhibition and apoptosis induction by *Scutellaria pinnatifida* A. Ham. on HL-60 and K562 leukemic cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *39*(1), 307-312.
108. Peng, Z. F., Lan, L. X., Zhao, F., Li, J., Tan, Q., Yin, H. W., & Zeng, H. H. (2008). A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, *9*(1), 16-21.
109. Pizzo, A., Salmeri, F. M., Ardita, F. V., Sofo, V., Tripepi, M., & Marsico, S. (2002). Behaviour of cytokine levels in serum and peritoneal fluid of women with endometriosis. *Gynecologic and obstetric investigation*, *54*(2), 82-87.
110. Jacob, S. W., & Herschler, R. (1986). Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, *23*(1), 14-27.

111. Notman, R., Noro, M., O'Malley, B., & Anwar, J. (2006). Molecular basis for dimethylsulfoxide (DMSO) action on lipid membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 128(43), 13982-13983.
112. Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P., & Kothari, V. (2009). Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet J. Microbiol*, 7(1).
113. Brayton, C. F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *The Cornell Veterinarian*, 76(1), 61-90.
114. Morrison, R. T. & Boyd, R.N. (1998). *Química Orgánica*. Boston, Massachusetts, USA: Allyn and Bacon.
115. Wadhvani, T., Desai, K., Patel, D., Lawani, D., Bahaley, P., Joshi, P., & Kothari, V. (2009). Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials. *Internet J. Microbiol*, 7(1).
116. de Santibañes, M., Sánchez Claria, R., de Santibañes, E., Pekolj, J., Mazza, O. (2019). New progress in the treatment of locally advance pancreatic cancer. *Medicine Buenos Aires*.79:576-581.
117. Gorbet, M. J. & Renjan, A. (2019). Cancer immunotherapy with immunoadjuvants, nanoparticles, and checkpoint inhibitors: Recent progress and challenges in treatment and tracking response to immunotherapy. *Pharmacol Ther*. 18:107456.

8. Anexo

8.1. Anexo 1. Curva de estándares para las citoquinas IL-1 β , IL-6 y TNF- α .

