



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE NUEVAS MOLECULAS PARA LA
ACTIVIDAD ANTITUMORAL EN LINEAS CELULARES
TUMORALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
ARACELI PELCASTRE GARCIA



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

1999

278883



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

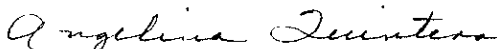
Jurado asignado:

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal Prof. Ofelia Espejo González.
Secretario: Prof. Homero Hernández Montes.
Primer Suplente: Prof. Marina Gavilanes Ruiz.
Segundo Suplente: Prof. Sobeida Sánchez Nieto.

Sitio donde se desarrolló el tema:

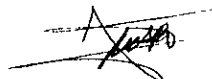
Laboratorio de Biología Molecular.
Departamento de Biología.
Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor del tema:



Dra. Angelina Quintero Ruiz.

Supervisor Técnico:



Q.F.B. José Dolores Solano Becerra

Sustentante:



Araceli Pelcastre García.

DEDICATORIAS.

A Dios.

Por estar siempre conmigo, por todo cuanto me ha regalado y por darme la oportunidad de vivir.

A mis padres: Aurelia y Wenceslao.

Por su cariño, apoyo y comprensión durante toda mi vida, por esforzarse en ayudarme, por cuidarme, preocuparse por mí y por ayudarme a alcanzar mis objetivos

A mis hermanos: Jhovany, Elizabeth y Violeta.

Por los momentos felices que hemos compartido, por su amistad, comprensión y ternura que me ayudan a esforzarme para ser mejor cada día

A mis amigas: Ana Bertha y Graciela.

Por su amistad y apoyo incondicional, por dejarme compartir parte de mi vida con ustedes y por considerarme su amiga.

A B. Jesús.

Por el tiempo que hemos compartido, por tu alegría y entusiasmo, por todo cuanto me has ayudado y enseñado.

A G R A D E C I M I E N T O S

Dra. Angelina Quintero Ruiz.

Un reconocimiento especial para usted, por su orientación, ayuda, paciencia, apoyo y dedicación en la realización de este trabajo, por la amistad y confianza que me ha brindado.

José D. Solano Becerra.

Agradezco infinitamente los consejos y la ayuda que me brindaste, para realizar los cultivos celulares, y para la elaboración de este trabajo, así como tu amistad y apoyo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y especialmente a la Facultad de Química.

Por todos los momentos hermosos que he vivido en ella, y por que de ella recibí una formación profesional y humana.

A todos mis profesores.

Por que cada uno de ustedes ha sabido enseñarme con paciencia y alegría.

•

A todos mis compañeros y amigos.

Pues han compartido parte de su vida conmigo y me han dejado compartir la mía con ustedes.

A todas las personas del Laboratorio de Biología Molecular.

Pues cada uno de ustedes a sabido orientarme y me ha brindado su amistad durante la realización de este trabajo.

Al profesor Orlando Abrajan.

Por la paciencia que me tubo para el registro de este trabajo

A los miembros del jurado.

Prof Angelina Quintero Ruiz.

Prof Ofelia Espejo González.

Prof. Homero Hernández Montes.

Prof Marina Gavilanes Ruiz.

Prof. Sobeida Sánchez Nieto

Por el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo y por sus valiosos comentarios con la finalidad de enriquecerlo.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de este trabajo

G R A C I A S

ÍNDICE

	PAGINA
1. RESUMEN	1
2. OBJETIVOS	3
3. HIPÓTESIS	4
4. ANTECEDENTES TEÓRICOS	
4.1 Cáncer	5
4.2 Fármacos en la terapia del cáncer	7
4.2.1 Taxol	9
4.2.2 Lactonas sesquiterpénicas	10
4.2.3 Compuestos heterocíclicos	20
4.3 Mecanismo de acción de compuestos antitumorales	23
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
5.1 Líneas celulares empleadas	29
5.2 Técnicas empleadas	
5.2.1 Descongelamiento de células	30
5.2.2 <i>Mantenimiento de las células</i>	31
5.2.3 Congelamiento	32
5.2.4 Conteo de células	33
5.2.5 Inicio del cultivo celular para la evaluación de los compuestos	34
5.2.6 Compuestos empleados	
5.6.2.1 Preparación de los compuestos	36
5.2.7 Técnica del MTT para medir la viabilidad celular	
5.2.7.1 Fundamento de la técnica	37
5.2.7.2 Procedimiento	38
5.2.8 Determinación de la IC ₅₀	39

5.3 <i>Preparación de soluciones</i>	
5.3.1 Medios de cultivo	41
5.3.2 Medios de congelamiento	42
5.3.3 Solución de PBS-EDTA	43
5 3.4 Solución de MTT	44
5.3.5 Solución Salina Isotónica	44
5.3.6 Solución de Trispsina 0.05%	45
5 3.7 Solución de Etanol 75%	45
5.4 <i>Análisis Estadístico</i>	46
6. RESULTADOS	47
7. DISCUSIÓN	72
8. CONCLUSIONES	78
9. PERSPECTIVAS	79
10. ABREVIATURAS	80
11. BIBLIOGRAFIA	83

1. RESUMEN.

El cáncer puede definirse, como la pérdida de la regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma celular que afectan la expresión o función de genes, dando como resultado la formación de un tumor maligno debido a la multiplicación desordenada de las células de un tejido u órgano.^(4, 5)

La quimioterapia representa una alternativa para el tratamiento del cáncer, y su objetivo, es atacar selectivamente al proceso metabólico implicado en la condición patológica,⁽⁶⁾ sin embargo, existen algunas barreras para el tratamiento, tales como la heterogeneidad biológica y la resistencia de muchas células tumorales a los agentes convencionales contra el cáncer, lo que ha motivado un gran número de investigaciones con el fin de buscar nuevos fármacos para combatir la enfermedad,^(1, 7) en donde algunos compuestos obtenidos de productos naturales, proveen la mayor esperanza terapéutica para el tratamiento del cáncer.⁽¹¹⁾ Uno de los fármacos obtenido de esos productos, y que es usado corrientemente en la clínica es el taxol comercialmente conocido como paclitaxel.⁽¹¹⁾ Además las lactonas sesquiterpénicas y sus derivados (naturales, sintéticos o semisintéticos) son compuestos, que dentro de sus bastas funciones tienen una actividad antitumoral, cuando son probadas frente a diferentes líneas celulares de cáncer.^(23, 24, 28, 32, 33) Por su parte los compuestos heterocíclicos presentan estructuras y actividades biológicas muy variadas, dentro de las cuales los compuestos que presentan anillos de pirimidina son compuestos que presenta actividad antitumoral, cuando son probados en líneas celulares tumorales.⁽⁴⁵⁾

En el presente trabajo se evaluó la actividad de diversos derivados de lactonas sesquiterpénicas, y compuestos heterocíclicos frente a líneas celulares de cáncer de cervix (CALO y HeLa), colon (SW620 y SW480) y mama (MCF-7), con la finalidad de determinar si estos compuestos presentan una actividad anticancerígena generalizada.

Los compuestos fueron probados a una concentración de 15 μM en cada línea celular durante 48 horas, y la viabilidad celular fue medida mediante la técnica de reducción de la sal de tetrazolio (MTT), como control positivo del ensayo se usó taxol a una concentración de 0.25 μM .

De los derivados de lactonas sesquiterpénicas probados (I-VII), solo el III y el IV presentaron una actividad antitumoral frente a todas las líneas celulares empleadas, para estos compuestos además fue determinado el valor de IC_{50} , a 72 horas de exposición en las líneas celulares HeLa y SW480, con la finalidad de conocer la potencia de dichos compuestos, usando también la técnica del MTT para medir la viabilidad celular. Los valores de IC_{50} para los compuestos III y IV en la línea celular HeLa fueron de 16.4 μM y 30.3 μM respectivamente, mientras que en las células SW480 se obtuvieron los valores de 73.5 μM para el compuesto III, y de 80.4 μM para el compuesto IV.

De los compuestos heterocíclicos probados (VIII, IX y X) a una concentración de 15 μM ninguno mostró una actividad antiproliferativa considerable, por lo que fueron reevaluados usando una concentración de 25 μM , en las líneas celulares CALO, SW620, SW480 y MCF-7, utilizando el mismo protocolo, pero ninguno de ellos presentó actividad antitumoral con el aumento de la concentración.

2. OBJETIVOS.

- Determinar la posible actividad antitumoral de nuevas moléculas, derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos.
- Medir la potencia antitumoral que presentan los compuestos mencionados con anterioridad.

3. HIPÓTESIS.

- Los derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos podrán presentar actividad antiproliferativa en líneas celulares tumorales, en base a sus estructuras y de acuerdo a lo reportado en la literatura ^(23, 33, 45)

4. ANTECEDENTES TEÓRICOS.

4.1 CÁNCER.

Una célula normal crece, se divide y lleva a cabo funciones específicas bien definidas, dependiendo del órgano o tejido al cual pertenezca.⁽¹⁾ No obstante la regulación metabólica de la célula puede alterarse por agentes químicos como las radiaciones, físicos como fármacos o alimentos, biológicos como virus, o una combinación de los anteriores, produciendo una modificación genética que da origen a una célula tumoral.⁽¹⁾

Entre las características generales de las células tumorales se encuentran, la proliferación descontrolada y la formación de metástasis ⁽¹⁾ Cuando las células de un tumor se encuentran dentro de una localización estable, y no invaden otros tejidos se forma un tumor benigno, mientras que en los tumores malignos (cáncer), las células pueden separarse del tumor y viajar a través del sistema circulatorio o linfático, para establecerse en otros tejidos adecuados para su desarrollo, dando lugar a una metástasis.⁽¹⁾

Las células tumorales son conocidas por poseer altos grados de mutación, con relación a su contraparte normal, posiblemente debido a la inactivación de proteínas críticas que reprimen el ciclo celular, y que son necesarias en los mecanismo de reparación del DNA, y otros procesos celulares.⁽²⁾ La inestabilidad genética en muchas células tumorales, juega un papel importante para la progresión del tumor, metástasis y desarrollo de resistencia a agentes anticancerígenos, y de igual manera la inestabilidad epigenética, que es una noción bastante general que engloba todos aquellos aspectos del desarrollo del ser vivo, que no son una expresión directa del programa genético de cada célula del embrión, sino que de lo contrario depende de las acciones mutuas entre las células, puede jugar un papel importante en la progresión del tumor y metástasis.⁽²⁾

El cáncer es la segunda causa más frecuente de muerte, en Estados Unidos alcanzó el 25 % del total de descensos en 1989 ⁽³⁾ El cáncer puede definirse, como la perdida de la

regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma celular, que afectan la expresión o función de genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular, además involucra la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores, dando como resultado la formación de un tumor maligno, debido a la multiplicación desordenada de las células de un tejido u órgano.^(4, 5)

De gran importancia es el reconocimiento de los problemas que resultan de la heterogeneidad de los tumores, pues cada tumor puede contener muchas subpoblaciones de células neoplásicas, que difieren en características cruciales como su cariotipo, morfología, inmunogenicidad, velocidad de crecimiento, capacidad para producir metástasis, y especialmente su respuesta a los agentes antineoplásicos.⁽⁵⁾

Un tumor esta constituido por diferentes tipos de células, como son: células neoplásicas que están en proliferación, células en estado G₀ y células muertas.⁽¹⁾

El cáncer es un padecimiento que ha motivado un gran número de investigaciones, con el fin de buscar nuevos fármacos para combatirlo, las principales barreras para el tratamiento de este padecimiento son. la heterogeneidad biológica de las células cancerosas, y la resistencia de algunas de ellas a muchos de los agentes convencionales contra el cáncer.^(1, 7)

En la actualidad podemos mencionar un número importante de enfermedades neoplásicas, que pueden ser curadas mediante un tratamiento que emplee únicamente agentes quimioterapéuticos, o estos combinados con otros métodos, estas neoplasias incluyen el coriocarcinoma en mujeres, la leucemia aguda, el tumor de Wilms, el sarcoma de Ewing, el rhabdomyosarcoma y el retinoblastoma en los niños, la enfermedad de Hodgkin, varios tipos de linfoma no Hodgkin, y el carcinoma testicular.^(6a) Las neoplasias humanas que en la actualidad son más susceptibles al tratamiento quimioterapéutico, son aquellas que tienen una gran fracción celular en crecimiento, es decir un alto porcentaje de células en proceso de división.^(6a) De la misma manera los tejidos normales que proliferan rápidamente

(médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal), pueden ser dañados por algunos de compuestos antineoplásicos potentes, y esta toxicidad con frecuencia limita la utilidad de estos.^(6a)

No obstante algunos cambios bioquímicos pueden producir resistencia a los fármacos antineoplásicos, para más de un agente en donde el gen MDR1 esta asociado con la multirresistencia, y esto puede limitar en forma severa el ámbito de fármacos potencialmente efectivos.^(2, 6a)

4.2 FÁRMACOS EN LA TERAPIA DEL CÁNCER.

El tratamiento quimioterapéutico antineoplásico, se refiere al uso de fármacos para combatir el crecimiento de células neoplásicas en un tumor.⁽⁸⁾ El objetivo de la quimioterapia es, atacar selectivamente al proceso metabólico implicado en la condición patológica.⁽⁸⁾ El tratamiento del cáncer generalmente se realiza a través de radiaciones e histerectomía, y como complemento se usa la quimioterapia.⁽⁸⁾ La combinación de radioterapia con quimioterapia, ofrece un mayor rendimiento de recuperación y respuesta.⁽⁸⁾

Entre los fármacos usados ampliamente en la quimioterapia de cáncer se encuentran incluidos, la adriamicina, el cis-platino, la vinblastina, la vincristina, el VP-16, el taxol, la camptotecina, nuevas entidades químicas tales como el Linomide (quinolina-3-carboxamida), el fenilbutirato, los inhibidores de la ribonucleotidasa, el dietilestilbestrol, L-(-)-dioxolona-citidina, los derivados de retinoides, y los modificadores de las señales de transducción, tales como los ésteres de forbol, dependiendo del tipo de cáncer a tratar.⁽⁹⁾

Incrementar el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales los agentes quimioterapéuticos actúan, puede inducir al desarrollo de nuevos fármacos o usos más efectivos de los disponibles actualmente.⁽¹⁰⁾ Los fármacos antineoplásicos según Goodman se clasifican de la siguiente manera.^(6b)

- a) Agentes alquilantes: sus efectos terapéuticos y citotóxicos, están relacionados directamente con la alquilación del DNA, aunque la alquilación de una sola cadena de DNA, puede con frecuencia ser reparada con relativa facilidad, los enlaces cruzados intercatenarios producidos por los agentes alquilantes bifuncionales, necesitan de un complejo mecanismo de reparación que en dosis bajas pueden ser corregidos, pero dosis mayores conducen a la ruptura del DNA. La resistencia adquirida a los agentes alquilantes es común, y puede inducir resistencia cruzada a otros agentes.^(6b)
- b) Antibióticos antitumorales: son compuestos que contienen una estructura muy variada, y actúan ya sea por alquilación o por intercalación en el DNA, bloqueando tanto la transcripción del DNA por la RNA polimerasa, como la síntesis de DNA. El mecanismo de resistencia es muy variado, pero se presenta principalmente por una alteración en la actividad de ciertas enzimas.^(6b)
- c) Antimetabolitos: son compuestos que inhiben la síntesis del DNA, actuando como falsos precursores de ácidos nucleicos. El mecanismo de resistencia a este tipo de compuestos es diverso y depende de que los compuestos sean análogos del ácido fólico, de la pirimidina o de la purina.^(6b)
- d) Miscelánea de fármacos: es una clase heterogénea de compuestos, cuyo mecanismo de acción es desconocido o no puede clasificarse en ninguno de los demás grupos. Su mecanismo de resistencia también es muy heterogéneo.^(6b)
- e) Hormonas y agentes relacionados: estos compuestos poseen un gran valor para ciertos órganos, que con frecuencia son el lugar de desarrollo primario de una neoplasia. Los carcinomas que se desarrollan aquí retienen con frecuencia durante períodos variables, algunos de los requerimientos hormonales de los órganos normales, al cambiar el entorno hormonal de estos tumores es posible alterar el curso del proceso neoplásico.^(6b)
- f) Productos naturales: este grupo es muy heterogéneo, en él podrían incluirse también el grupo de los antibióticos antitumorales y sus mecanismos de acción son diversos. La

mayoría de las actividades biológicas de este tipo de compuestos pueden deberse, a su capacidad para unirse en forma específica a la tubulina y de esta manera bloquear la facultad de la proteína para polimerizarse en los microtúbulos ^(6b)

4.2.1 TAXOL.

Entre los compuestos que proveen la mayor esperanza terapéutica para el tratamiento del cáncer, se encuentran los obtenidos de productos naturales.⁽¹¹⁾ Uno de esos fármacos es el taxol, el cual es usado corrientemente en la clínica con el nombre comercial de paclitaxel; sin embargo la obtención de cantidades adecuadas de este compuesto es rara en las fuentes naturales, lo cual representa un problema.⁽¹¹⁾ Este compuesto se obtiene de la corteza de árbol *Taxus brevifolia* Nuttall (Taxaceae), con un rendimiento de 0.007% ⁽¹¹⁾

Los inhibidores de los microtúbulos tales como el taxol, tienden a ser efectivos en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, incluyendo metástasis de mama, que es el cáncer más común en las mujeres Americanas,⁽¹⁰⁾ cáncer de ovario, esófago, próstata, vejiga, endometrio, cervix y cáncer de pulmón de células no pequeñas, así como sarcoma de Kaposi's y linfoma.^(11, 12, 13) El taxol no actúa directamente sobre el DNA,⁽¹⁰⁾ su mecanismo primario de acción es atribuido a su habilidad para unirse a los microtúbulos y prevenir su desarme, formando un polímero con propiedades de estabilidad alteradas, previniendo así la división celular.^(13, 14, 42) Los efectos del taxol están correlacionados con un incremento en la polimerización de la tubulina, unión a la tubulina y la detención del ciclo celular, el cual tiene como blanco celular al sistema tubulina/microtúbulo que juegan un significativo papel en la mitosis, transporte intracelular, movilidad celular y mantenimiento de la forma celular.^(12, 15, 16) Torres, et al, ⁽¹⁵⁾ sugieren que la muerte celular inducida por taxol puede ser el resultado de dos diferentes mecanismos, que a bajas concentraciones de taxol (< 9 nM) la muerte celular puede ocurrir después de una mitosis aberrante, lo que induce la segregación anormal de

los cromosomas, dichas concentraciones pueden ser suficientes para retrasar la función mitótica, pero insuficientes para inducir la detención mitótica, mientras que concentraciones altas de taxol (≥ 9 nM) provocan la detención de las células en la fase mitótica del ciclo celular y prolongan dicha detención, estimulando la apoptosis y dando como resultado la muerte celular. ^(12, 15) Por lo tanto el taxol puede inducir la muerte celular por diferentes mecanismos, dependiendo de la concentración del compuesto ⁽¹⁵⁾

Se ha visto que la proteína Raf-1, es mediadora de la apoptosis inducida por taxol, y que interacciona con proteínas involucradas en la mitosis, tales como la proteína Cdc25A que regula la transición de G_2-M ⁽¹⁵⁾

Además se han observado cambios en el estado de fosforilación de proteínas que regulan la transición G_2-M , así como de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L después del tratamiento a taxol a una concentración de 10 nM, sin embargo las proteínas proapoptóticas como Bax permanecen sin cambio, ^(12, 15, 17) y se ha propuesto que la fosforilación de Bcl-2, reduce la formación de heterodímeros con Bax revocando su habilidad de prolongar la supervivencia celular, ^(12, 17) además se altera la expresión de algunos genes como c-jun, que incrementa su expresión, mientras la de c-myc permanece sin cambios después del tratamiento con taxol. ^(10, 13)

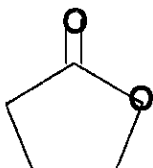
Adicionalmente el taxol induce la producción de citocinas, tales como la IL-1, y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), e incrementa la actividad mitogénica de proteínas cinasas, y promueve además la activación del promotor de la IL-8, que esta correlacionado en gran parte con la muerte celular. ^(13, 15)

Es conocido que la muerte celular inducida por paclitaxel esta asociada con eventos moleculares múltiples y diversos, incluyendo la polimerización de la tubulina, fosforilación de Bcl-2, fosforilación de Raf-1, activación de p34^{cdc2}, ⁽¹⁸⁾ e inhibición de la angiogénesis. ⁽¹⁴⁾

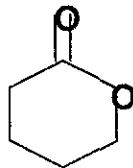
4.2.2 LACTONAS SESQUITERPÉNICAS.

Lactonas. Los ésteres se encuentran entre los compuestos más importantes y más difundidos en la naturaleza.^(19a) Muchos ésteres de peso molecular bajo son líquidos de olor agradable, que imparten sus aromas a flores y frutas.^(19a) Por ejemplo el butanoato de metilo se ha aislado de aceite de piña y el acetato de isopentilo es un constituyente del aceite de plátano.^(19a) Los enlaces de éster también están presentes en las grasas animales y en muchos compuestos de importancia biológica.^(19a)

Los ésteres cíclicos son llamados lactonas.^(19a) Debido a la estabilidad de los ciclos en los compuestos orgánicos, las lactonas más comunes son las que contienen cuatro y cinco átomos de carbono.^(19a)

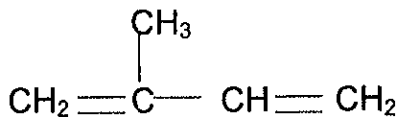


Butirolactona (4 átomos de Carbono)



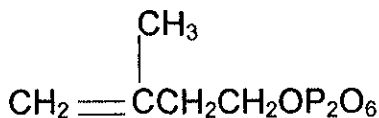
Valerolactona (5 átomos de Carbono)

Compuestos sesquiterpénicos. Los terpenos son moléculas orgánicas, relativamente pequeñas con una inmensa diversidad de estructuras.^(19c) Se conocen miles de terpenos diferentes; algunos son hidrocarburos, otros contienen oxígeno, algunos son molécula de cadena abierta algunos más contienen anillos.^(19c) Todos los terpenos están relacionados independientemente de sus aparentes diferencias estructurales.^(19c) Los terpenos son compuestos formados a partir de unidades de isopreno.^(19c)

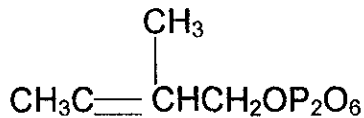


UNIDAD DE ISOPRENO (2-metil-1,3-butadieno).

Sin embargo el isopreno no es el precursor biológico de los terpenos, en vez de ello la naturaleza utiliza para la biosíntesis de los terpenos dos "equivalentes" de isopreno, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP). Estas moléculas de cinco átomos de carbono se forman por la condensación de tres unidades de acetil CoA.^(19c)



Piforosfato de isopentenilo (IPP).



Pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP).

Los terpenos se clasifican según el número de unidades de isopreno que contengan.^(19c) Los sesquiterpenos son moléculas de 15 átomos de carbonos formados a partir de 3 unidades de isopreno, estos compuestos se encuentran principalmente en las plantas.^(19c)

Lactonas sesquiterpénicas. Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios de los productos naturales,⁽²²⁾ que se presentan en muchas familias de plantas, dentro de las que se incluyen las siguientes: Acanthaceae, Anacardiaceae, Apiaceae, Euphorbiaceae, Lauraceae, Magnoliceae, Menispermaceae, Rutaceae, Winteaceae, y Hepatidae, sin embargo el mayor número de lactonas sesquiterpénicas ha sido reportado en la familia Asteraceae, con más de 3000 estructuras diferentes reportadas, en esta familia es común encontrar los constituyentes activos en las partes aéreas de las plantas, estos compuestos son conocidos por sus actividades biológicas variables.^(23, 24, 25)

Actividades biológicas de las lactonas sesquiterpénicas. Dentro de sus actividades se incluyen: citotoxicidad frente a células tumorales, en lo cual la toxicidad de estos compuestos puede ser comparada con la del cisplatino,^(22, 23) la actividad antitumoral se ha observado en células de leucemia de ratón P-388,⁽²⁶⁾ L-1210 y P815^(23, 27) y en líneas

celulares de cáncer humano A549, A427 (carcinoma de pulmón),^(28, 29, 30, 31) GLC₄ (células pequeñas de cáncer de pulmón),⁽³²⁾ MCF-7 (adenocarcinoma de mama),^(28, 30) HCT-15, HT-20, HT-29 (adenocarcinoma de colon),^(28, 29, 30) células COLO 320 (cáncer colorectal),⁽³²⁾ HL-60 (leucemia),^(29, 30) SK-OV-3 (adenocarcinoma de ovario),⁽³⁰⁾ Malme-3M (melanoma maligno),^(29, 30) en la línea celular de tumores ascites de Erlich EN2,⁽²³⁾ PC-3, DU145 (cáncer de próstata)⁽³¹⁾ y células tumorales HeLa (cáncer de cervix) Las lactonas sesquiterpénicas también muestran actividad aunque menor frente a células no pequeñas de cáncer de pulmón, cáncer de SNC, y líneas celulares de cáncer renal.⁽³³⁾ Debido a esto las lactonas sesquiterpénicas pueden tener potencial utilidad en el tratamiento de tumores sólidos.⁽²⁴⁾

Además se ha encontrado que presentan actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus lutea*, pero no son eficientes contra ninguna bacteria Gram-negativa.⁽²⁷⁾ Las lactonas sesquiterpénicas también presentan actividad antifúngica,⁽²²⁾ e inhibitoria del fitocrecimiento.^(22, 28)

Por otra lado estos compuestos previene significativamente, lesiones gástricas producidas por etanol, e inhiben la formación de erosiones en una manera dependiente de la dosis,^(24, 34) por lo que se considera que poseen una actividad antiulcerativa.⁽²⁵⁾ Se ha especulado que esta actividad puede estar relacionada con la inducción de la liberación de prostaglandinas endógenas.⁽²⁴⁾ Previamente se ha demostrado que las prostaglandinas pueden proteger la superficie epitelial contra algunos tipos de daño, por aumentar la cantidad de fosfolípidos en la superficie, lo cual hace hidrofóbica la superficie de la mucosa y así disminuye la accesibilidad de ácidos y otros agentes solubles en agua.⁽²⁴⁾

Se ha observado que las lactonas sesquiterpénicas incrementan el cAMP por inhibir a la fosfodiesterasa, aumentando la contractilidad del miocardio,⁽²⁴⁾ lo que confiere a dichos compuestos una actividad cardiotónica.^(24, 25)

Se ha hipotetizado también que las lactonas sesquiterpénicas pueden ser tóxicas o repeler a algunos ectoparásitos como pulgas, garrapatas y algunos insectos como el mosquito ⁽²⁴⁾ Además se ha observado que algunas de ellas poseen actividad antimalárica, pues inhiben significativamente el crecimiento del parásito *Plasmodium falciparum*.⁽³⁵⁾

También se ha investigado la actividad profiláctica, y estos compuestos además tienen la capacidad de reducir la incidencia y severidad de las migrañas.⁽²⁴⁾

Estos compuestos inhiben la expresión del gen que codifica para la proteína NF-κB, la cual es un mediador central de la respuesta inmune humana y regula la transcripción de varias citocinas tales como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF-α, así como genes que codifican para moléculas de adhesión, genes requeridos para la presentación de antígenos,⁽²⁰⁾ y enzimas inflamatorias tales como la sintasa inducible con óxido nítrico, la ciclooxigenasa II,^(20, 24, 36) 5-lipooxigenasa, y la fosfolipasa A₂ citosólica.^(36, 37, 38, 39) Se sabe que la proteína NF-κB posee una función antiapoptótica,⁽³⁷⁾ aunque el mecanismo mediante el cual este factor protege a las células de la apoptosis no es claro.⁽³⁷⁾ La producción del factor de necrosis tumoral α (TNF-α), es inhibida por las lactonas sesquiterpénicas en una manera dependiente de la concentración.⁽²⁵⁾ El TNF-α es un factor que está involucrado en diversas enfermedades inflamatorias y alérgicas, tales como el asma, artritis reumatoide, inflamación aguda, "shock" endotóxico, enfermedades alérgicas de la piel y rechazo de trasplantes de órganos,⁽²⁵⁾ el TNF-α, también posee considerable actividad citotóxica, especialmente contra células tumorales.⁽³⁶⁾ Con relación a su actividad anti-inflamatoria se ha visto que algunas lactonas sesquiterpénicas, son más efectivas que los compuestos anti-inflamatorios no esteroideos tales como la indometacina.⁽²⁰⁾ Las lactonas sesquiterpénicas también afectan diferentes procesos inflamatorios in vitro, por ejemplo la migración de neutrófilos polimorfonucleares humanos y la quimiotaxis de estos, la síntesis de mediadores químicos, todo lo cual está relacionado con su actividad anti-inflamatoria, además pueden desacoplar efectivamente la fosforilación oxidativa y elevar los niveles de cAMP.⁽⁴⁰⁾

Recientemente ha sido observada una nueva actividad en las lactonas sesquiterpénicas, la actividad de inhibición del complejo enzimático conocido como aromatasas citocromo P450, el cual cataliza la biosíntesis de los estrógenos.⁽²¹⁾ La regulación de esta enzima juega un papel importante en muchos procesos fisiológicos y en ciertas enfermedades, de las cuales la más importante es el cáncer de mama dependiente de estrógenos.⁽²¹⁾ Se ha sugerido que esta actividad puede ser debida a que las lactonas sesquiterpénicas compitan con la testosterona por el sitio de unión al sustrato de la enzima.⁽²¹⁾

Diversos estudios además muestran que las lactonas sesquiterpénicas interfieren con algunos procesos celulares incluyendo la agregación de las plaquetas, la liberación de histamina y serotonina.⁽²⁰⁾ Algunos derivados también inhiben la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP, la salida de protones y el transporte de electrones, actuando como inhibidores de la reacción de Hill, inhibiendo así el crecimiento de los organismos fotosintéticos.⁽²⁸⁾

A pesar de las bastas funciones de las lactonas sesquiterpénicas, la aplicación clínica de estos compuestos es limitada, debido a su considerable citotoxicidad.⁽³³⁾ Se han evaluado algunos efectos tóxicos de estos compuestos, y se ha sugerido que las lactonas sesquiterpénicas pueden causar desórdenes neurodegenerativos, y dermatitis por contacto.⁽²⁴⁾ Se sabe que la repina, una lactona sesquiterpénica ocasiona en los caballos un síndrome similar al Parkinson.⁽²⁴⁾ En algunos experimentos realizados con ratones se ha visto que estos compuestos causan convulsiones, e incluso pueden ser letalmente tóxicos para estos animales.⁽⁴¹⁾ Además se ha observado que el uso externo frecuente (por vía cutánea) de la tintura o el ungüento de Arnica por humanos, puede inducir reacciones alérgicas resultando en dermatitis por contacto.⁽⁴²⁾ Se sabe que es extremadamente peligroso beber Arnica en cualquier forma, como té o tintura diluida, ya que esto puede

producir un irregular dolor de cabeza, problemas de circulación, dolor estomacal, envenenamiento, aborto e incluso la muerte.⁽⁴²⁾

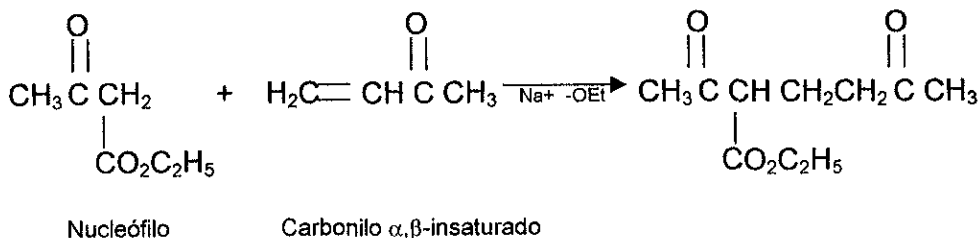
A pesar de sus efectos tóxicos, las plantas que contienen lactonas sesquiterpénicas son usadas como remedios herbales en diferentes culturas.⁽²⁴⁾ Algunas de las plantas medicinales más importantes que contienen a las lactonas sesquiterpénicas como constituyentes activos son: *Arnica montana*, la cual es utilizada como remedio anti-inflamatorio,⁽²⁰⁾ cuya tintura incluso a sido internacionalmente usada para mejorar la circulación sanguínea del músculo cardiaco,⁽³²⁾ o bien los extractos son aplicados localmente como comprimidos o ungüentos para el tratamiento de hematomas, contusión, torceduras, enfermedades reumatoides e inflamaciones superficiales de la piel.⁽²⁰⁾ La raíz de *Ratibida mexicana*, es usada por los indios Tarahumaras para el tratamiento de reumas, y otras tribus indias la usan para detener los dolores de cabeza y escalofríos.⁽²⁸⁾ La raíz de *Saussurea lappa* es usada en la medicina de Korea y China para síntomas tales como falta de apetito, dolor epigástrico o abdominal, distensión, náuseas, vómito, alergia e inflamación,⁽²⁵⁾ las lactonas sesquiterpénicas que se encuentran en esta planta exhiben efectos inhibitorios en la función de muerte de linfocitos T, inhiben también la expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y la contracción de la aorta.⁽²⁵⁾ *Inula Britannica* L: var. *Chinensis* es usada para el tratamiento de desordenes digestivos, bronquitis e inflamaciones como una medicina tradicional en el Este de Asia.⁽³⁰⁾ En América central los extractos de *Tithonia diversifolia*, A. Gray, son usados oralmente para tratar la malaria y externamente se usan poco para el tratamiento de hematomas y heridas.⁽³⁹⁾ Las partes aéreas de la planta *Artemisia douglasiana*, son usadas tradicionalmente como agentes citoprotectores contra el desarrollo de úlceras pépticas.⁽³⁴⁾ *Neurolaena lobata* es una planta medicinal popular de América Central la cual es utilizada para combatir los dolores estomacales, debilidades nerviosas, anemias, diabetes, hipertensión, malaria, enfermedades hepáticas, cáncer, padecimientos de la piel,

además de ser usada como tónico y antipirético.⁽³⁵⁾ *Tanacetum parthenium*, es una planta ampliamente consumida en Inglaterra y otras regiones del norte de Europa como un remedio contra la artritis, y los dolores de cabeza característicos de la migraña.⁽²⁴⁾

El mecanismo de acción general considerado para las lactonas sesquiterpénicas es la alquilación de nucleófilos biológicos, especialmente grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína, por la estructura carbonilo α,β -insaturada en una reacción de adición tipo Michael, la unión covalente de las lactonas sesquiterpénicas a grupos sulfhidrilo libres de proteínas, puede interferir con la función de estas macromoléculas,^(23, 25, 32, 36) inhibiendo consecuentemente un gran número de enzimas involucradas en procesos biológicos claves, como la síntesis de RNA y DNA, síntesis de proteínas, síntesis de purinas, glicólisis, ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte electrónico mitocondrial.⁽²³⁾ Aunque los blancos exactos afectados por las lactonas sesquiterpénicas no son conocidos, se ha especulado que el efecto citotóxico puede ser una consecuencia de la alquilación de diversos sitios enzimáticos.⁽²³⁾ Una de las enzimas que se sabe posee grupos sulfhidrilo, los cuales son alquilados por las lactonas sesquiterpénicas por medio de una reacción de Michael, es la topoisomerasa II, la cual está implicada en la replicación y transcripción del DNA y en la segregación cromosómica.⁽⁴³⁾

Reacción de Michael. Cuando un nucleófilo, reacciona con un compuesto carbonílico α,β -insaturado, ocurre una adición conjugada conocida como reacción de Michael.^(19b) La reacción de Michael ocurre por adición de un enolato (nucleófilo) como donador, al carbono β de un aceptor carbonílico α,β -insaturado.^(19b)

REACCION



En la reacción de Michael pueden actuar como componentes aceptores electrófilos, aldehídos, ésteres, nitrilos, nitrocompuestos y amidas, todos los cuales deben estar conjugados.^(19b) De manera similar, puede emplearse una variedad de donadores diferentes, incluyendo β -dicetonas, β -cetoésteres, ésteres malónicos, β -cetonitrilos y nitrocompuestos.^(19b)

Sin embargo la actividad individual de la lactonas sesquiterpénicas, no está correlacionada con el número de centros potencialmente alquilados.⁽²⁰⁾ Otros factores, tales como la conformación del esqueleto carbonílico básico, parece influir en la actividad y puede ser responsable de la selectividad de lactonas sesquiterpénicas.⁽²⁰⁾

En varios estudios de relación estructura actividad realizados se encontró lo siguiente:

a) Para la actividad antitumoral, el compuesto más lipofílico fue el más tóxico, ya que una mayor lipofiliidad facilita la penetración de los compuestos a través de la membrana plasmática lipofílica de las células tumorales, y subsecuentemente provoca un aumento en la citotoxicidad.^(23, 27) Se ha reportado para esta actividad la importancia del grupo α -metileno- γ -lactona, y de un anillo ciclopentenona o grupo carbonilo α,β -insaturado como componentes de la molécula,^(23, 32) cuando existe un éster como sustituyente en la molécula, a mayor volumen de dicho sustituyente, menor actividad antitumoral.⁽²³⁾ Si la molécula es un dímero, en donde los monómeros están unidos a través de un enlace éter, la estereoquímica que se

encuentra alrededor de este enlace influye en la citotoxicidad presentada por el compuesto.⁽³³⁾ La actividad antitumoral es aumentada por la presencia de cetonas conjugadas en la molécula,⁽²²⁾ o de un grupo α -hidroxilactona, aunque esta última modificación da inestabilidad a la molécula a pH básico o neutro, en donde el anillo de la lactona se abre, lo cual inactiva al compuesto, debido a que la reacción irreversible la lactona es solo activa a pH ácido.⁽³¹⁾ También se ha visto que el efecto citotóxico depende de la duración de exposición con los compuestos.⁽³²⁾

b) En cuanto a la actividad antifúngica; la γ lactona es un grupo importante para que se presente la actividad.⁽²⁸⁾

c) Para la actividad inhibitoria del fitocrecimiento el grupo α -metilen- γ -lactona es una característica estructural importante.⁽²⁸⁾

d) Para la actividad antiulcerativa; se ha reportado que la mitad α -metilen- γ -lactona es un requerimiento estructural necesario, para que se pueda presentar esta actividad biológica, mientras que un sustituyente ciclopentenona en la molécula, no está involucrado con dicha actividad.^(24, 34)

e) Para la acción citotóxica contra parásitos de la malaria; es reconocida que la mitad endoperóxido es responsable de dicha actividad,⁽³³⁾ y que además es requerido el grupo carbonilo α,β -insaturado.⁽³⁵⁾

f) Para la actividad anti-inflamatoria; la mitad α -metilen- γ -lactona contribuye en mucho a la actividad, mientras que la ciclopentenona α,β -insustituida y α -epoxiciclopentenona como componentes de la molécula, contribuyen en menor proporción.⁽⁴⁰⁾ Se ha sugerido que la inhibición de la quimiotaxis de neutrófilos polimorfonucleares, es debida a su mitad α -metilen- γ -lactona o su anillo α -epoxiciclopentenona.⁽⁴⁰⁾ Se ha observado que la saturación de dobles enlaces presentes en los grupos ciclopentenona y α -metilen- γ -lactona, de algunas lactonas sesquiterpénicas como la helenalina, da como resultado la pérdida de la actividad anti-inflamatoria.^(20, 40)

g) La estructura α -metilen- γ -lactona y α -epoxiciclopentenona, como componentes estructurales de la molécula, contribuyen significativamente para que se presente la actividad antiartrítica, y de igual manera el anillo β -insustituído ciclopentenona influye en dicha actividad.⁽⁴⁰⁾

h) Para la actividad inhibitoria de la síntesis de ATP la mitad α -metilen- γ -lactona, es importante pero no esencial.⁽²⁸⁾ Se ha observado que para la isoalcoalantolactona, el doble enlace de la posición 3,4 es un requerimiento estructural esencial.⁽²⁸⁾

i) El anillo ciclopentenona β -sustituído o insustituído que esta presente en algunas lactonas sesquiterpénicas, es un requerimiento estructural importante, para las actividades antitumoral y antimicrobiana, no así para la actividad antiulcerativa.⁽³⁴⁾

4.2.3 COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS.

Entre los compuestos heterocíclicos se ha encontrado que algunos tienen importantes funciones biológicas, ejemplos de ellos son los siguientes:

- Los análogos de los nucleósidos son un género importante de agentes antimetabólicos, los cuales exhiben actividades anticancerígena y antiviral. Estos compuestos tienen en su estructura una base heterocíclica de cinco miembros, cuando contienen además azufre en la región del azúcar o en la región heterocíclica, muestran una mayor actividad antiproliferativa contra virus o células cancerosas. Así resulta de interés la síntesis de análogos de nucleósidos con anillos de cinco miembros tio-sustituídos.⁽⁴⁴⁾ Cabe mencionar que las pirimidinas sustituidas son otra clase de compuestos heterocíclicos con potente actividad antitumoral.⁽⁴⁵⁾

- El metabolismo del folato representa un importante y atractivo blanco para la quimioterapia del cáncer, debido a su papel crucial en la biosíntesis de ácidos nucleicos, en donde el tetrahidrolato es el principal portador de unidades de un átomo de carbono, y la enzima hidrolato reductasa (DHFR) que junto con la timidilato sintasa (TS), forman parte del

sistema responsable de la síntesis de desoxirribonucleósidos. Así inhibidores de estas dos enzimas tienen importante utilidad clínica como agentes antitumorales, antibacterianos y antiprotozoarios. Diversos tipos de folatos han sido reportados como agentes antitumorales, por su acción como inhibidores de la TS, DHFR. ⁽⁴⁵⁾

- En décadas pasadas los antagonistas de los receptores de andrógenos, han demostrado ser efectivos para el tratamiento de cáncer de próstata, en donde los derivados de la quinolina, tienen potencial actividad como antagonistas de receptores de andrógenos. ⁽⁴⁶⁾

- Se sabe que el cAMP (segundo mensajero) juega un papel importante en la regulación del ciclo de crecimiento y diferenciación. La hidrólisis del cAMP da lugar a la formación del 5'-AMP, la reacción es catalizada por la fosfodiesterasa (PDE). Los derivados de la pirrolidinopterina son compuestos capaces de inhibir a la enzima PDE, induciendo así una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis cuando se prueban en células B16 de melanoma murino, células de carcinoma murino CarB, o células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Para la función de estos compuestos sobresale la importancia de los sitios de formación de enlaces por puentes de hidrógeno. ⁽⁴⁷⁾

- Los análogos sintéticos y naturales de los retinoides heterocíclicos aromáticos, ejercen profundos efectos en la diferenciación y proliferación celular, lo que les confiere utilidad para el tratamiento de desordenes hiperproliferativos, como son la psoriasis y ciertas formas de cáncer. Sin embargo uso de los retinoides en la terapia del cáncer está generalmente limitado, debido a los efectos adversos que ocasionan, tales como teratogénesis, irritación mucocutánea y síndrome de hipervitaminosis A. Muchos efectos biológicos de estos compuestos son mediados por la activación de receptores nucleares. ⁽⁴⁸⁾

- La combretastanina A-4 es uno de los agentes antimicóticos más potentes, se sabe que se une a la tubulina en el sitio de unión de la colchicina. Este compuesto y algunos de sus derivados muestran fuerte citotoxicidad, contra una variedad de células cancerosas humanas incluyendo líneas celulares multiresistentes. Se ha encontrado que estos

compuestos ejercen su actividad antitumoral, al reducir el flujo sanguíneo en el sitio del tumor, dando como resultando una necrosis hemorrágica en el tejido tumoral. Los derivados de combretastatina en donde se introduce un anillo heterocíclico, en la posición olefinica de la molécula muestran potente actividad antitumoral, antitubulinica y citotóxica in vivo, mejorando en algunos casos la actividad presentada por la combretastatina.⁽⁴⁹⁾

- Se ha observado que algunos de los colorantes de rodacianina exhiben selectiva actividad contra la línea celular de cáncer de colon CX-1, en relación a su contraparte normal (línea de epitelio normal CV-1). En este tipo de compuestos tiene gran importancia el carácter hidrofóbico de la molécula para la actividad antitumoral, la introducción de sustituyentes anionicos tales como grupos carboxilo e hidroxilo, inducen un decremento o perdida de la actividad antitumoral. El mecanismo estudiado para estos compuestos demuestra que algunos de ellos, inhiben la actividad respiratoria de la mitocondria en una manera dependiente de la dosis, e inducen una perdida selectiva del DNA mitocondrial en líneas celulares tumorales, pero no en células normales ⁽⁵⁰⁾

- Los benzotiazoles muestran una potente actividad inhibitoria cuando son probados in vitro, frente a una variedad de líneas celulares tumorales de cáncer de mama, ovario, pulmón, colon, cáncer renal y células de leucemia de ratón. El efecto de los benzotiazoles esta relacionado con su función como potentes inhibidores de tirosinas cinasas, que compiten por el sitio de unión del ATP a la enzima.⁽⁵¹⁾

- Los derivados de oxadiazoles, triazoles, imidazoles y tiazoles, son reportados como agentes antifúngicos y antimicrobianos siendo activos contra *Vibrio Cholerae* non O-1, *Klebsiella* y *Salmonella*, presentan además actividad anticonvulsiva y antitumoral, las cuales están relacionadas con la presencia de dos grupos carbonilo en la molécula. Se ha observado que su actividad antitumoral, es debida a que los compuestos interfieren con las metaloenzimas de las células tumorales, inhibiendo así su crecimiento. Algunos de estos compuestos pueden ser metabolizados a agentes quelantes in vivo. Adicionalmente se ha

encontrado que la hidrofobicidad de estos compuestos es esencial para permitir su entrada a los sitios intracelulares.⁽⁵²⁾

Debido a que dentro de los compuestos heterocíclicos se incluyen una gran variedad de moléculas estructuralmente diferentes, los estudios de relación estructura actividad de las diferentes acciones biológicas presentadas por estos compuestos, son realizados de manera independiente, para cada grupo de compuestos que presentan una heteroátomo diferente.

4.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE COMPUESTOS ANTITUMORALES.

Los fármacos antitumorales pueden actuar a diferentes niveles, para detener el desarrollo tumoral. Recientemente se ha reparado que algunos metabolitos endógenos, tales como el 2-metoxiestradiol, la angiostatina y la endostatina, pueden inhibir la angiogénesis, y detener de esta manera el desarrollo del tumor.^(53, 54) Aunque en la actualidad estos metabolitos no son aplicados clínicamente para el tratamiento del cáncer, algunos autores consideran que algún día estos compuestos podrán ser incorporados en la clínica ^(53, 54) El taxol es un compuesto ampliamente utilizado para el tratamiento de muchos tumores. Dentro de los mecanismos involucrados con la citotoxicidad de este compuesto, se encuentra su capacidad para inhibir la angiogénesis. ⁽¹⁴⁾

Angiogénesis. La angiogénesis es bien conocida como un paso clave en el desarrollo de un tumor y en la formación de metástasis,⁽⁵⁴⁾ ya que a través de ella se pueden formar nuevos vasos sanguíneos, que irrigen al tumor para aportarle los nutrientes necesarios para su desarrollo.^(53, 54) En este proceso se han caracterizado varios factores angiogénicos, secretados por las células tumorales como son: el factor FGF, FAG y angiogenina, los cuales tienen como mecanismo de acción común la atracción de células

endoteliales de vasos sanguíneos.⁽⁵³⁾ En las células tumorales los vasos sanguíneos formados no son destruidos, tal como ocurre en el ciclo de crecimiento celular normal, por lo que en el caso de tumores malignos, la angiogénesis se vuelve una función celular más importante.⁽⁵⁴⁾

Como ya se mencionó anteriormente el taxol tiene la capacidad para inhibir la angiogénesis,⁽¹⁴⁾ sin embargo se cree que su actividad antitumoral es debida en mayor parte a que inhibe la función del gen antiapoptótico bcl-2,⁽¹⁸⁾ el cual se sabe inhibe la apoptosis, dado que estimula la mitosis.^(55, 56, 57)

Apoptosis. La apoptosis también conocida como muerte celular programada, es un proceso activo dependiente de energía,^(58, 59, 60, 61) que requiere de la síntesis de proteínas,⁽³³⁾ y en muchos casos digestión endonucleolítica de DNA celular,⁽⁶²⁾ y que además depende de la expresión de ciertos onco-genes, como los de la familia Bcl-2 y genes supresores del tumor tales como p53.^(55, 87) En muchas circunstancias en las que ocurre la apoptosis esta es suprimida por inhibidores del mRNA y de síntesis de proteínas.⁽⁵⁵⁾

La apoptosis juega un papel crucial en varios eventos biológicos, como son: la embriogénesis, el desarrollo normal de los vertebrados, mantenimiento de homeostasis de órganos y tejidos y remoción de células autoinmunes, dañadas o viejas.^(55, 63, 64, 65, 66) Además de ser un importante proceso fisiológico normal, también es un mecanismo de defensa contra células tumorales (cáncer de próstata, pulmón, pecho y colon),⁽⁶⁷⁾ cuando estas son sometidas a modalidades de tratamiento bien establecidas, tales como irradiación, calor, tratamiento hormonal,⁽⁵⁵⁾ y/o con una variedad de compuestos quimioterapéuticos, incluyendo inhibidores de la síntesis de DNA, agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de los microtúbulos, y antimetabolitos.⁽⁶⁸⁾ De esta manera las células incapaces de experimentar la apoptosis pueden ser más susceptibles a la acumulación de alteraciones genéticas que las células normales,^(66, 69) lo que puede conferir algunos beneficios de supervivencia a tumores que están en desarrollo,^(16, 69) siendo este uno

de los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer, y en la resistencia de los tumores a la quimioterapia o radioterapia, lo que promueve la susceptibilidad a mutagénesis en células tumorales,⁽⁷⁰⁾ aunque la apoptosis puede ser encontrada virtualmente en todos los tumores malignos sin tratamiento.⁽⁶⁶⁾ En el sistema inmune, la apoptosis es responsable de la delección de células T autorreactivas en el timo.^(65, 61) Los estímulos que inducen la apoptosis provocan una respuesta celular compleja, que incluye un bloqueo reversible en la progresión del ciclo celular en las fases G₁ y G₂, lo que refleja la necesidad de las células de ganar tiempo para reparar el DNA dañado antes de la replicación y la segregación mitótica cromosómica, esto finalmente ocasiona la inducción de la muerte celular programada.^(9, 62) Así las señales apoptóticas son activadas por diversos estímulos que convergen hacia un camino de muerte común, en donde las proteínas de la familia Bcl-2 actúan como reguladores y la familia de las caspasas como transductores de señales.^(63, 71)

Familia Bcl-2. Existen numerosos genes que participan en la muerte celular programada, a través de sus productos proteicos como son los genes de la familia Bcl-2.^(60, 72) Las proteínas de esta familia juegan un papel central en el control de la apoptosis,⁽¹²⁾ por lo que también son llamadas proteínas relacionadas con la muerte celular (DRPs).⁽⁷⁰⁾ Todas las proteínas de esta familia tienen una secuencia homóloga de aminoácidos, y se distinguen dos subfamilias, una pro-apoptótica, que incluye a las proteínas, Bax, Bad, Bak, Bik, Bid, Bim, Blk, Hrk, Bcl-x_s y Bok/Mtd, las cuales promueven la muerte celular apoptótica, y la subfamilia anti-apoptótica que comprende a las proteínas, Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Mcl-1, A1 y BHRF, las cuales actúan como represores de muerte.^(65, 70, 73, 88) La expresión de algunas de estas DRPs como Bcl-2, Bcl-x_L y Bax, ha sido asociada significativamente con el grado histológico de algunos tumores.⁽⁷⁰⁾

Caspasas. La caspasas son cisteín proteasa correspondientes a la familia CED-3/ICE, las cuales a diferencia de otras cisteín proteasas mamíferas existen en el citosol como zimógenos, que requieren de un preciso procesamiento, para generar una enzima

con dos subunidades activas.^(75, 76, 77) Estas caspasas son capaces de activar a otras de manera análoga a las proteasas zimogénas de la casada de coagulación o de complemento.⁽⁷⁷⁾

Las caspasas activas dirigen la degradación de varios substratos proteicos celulares, tales como actina, poli(ADP-ribosa) polimerasa y lamina, los cuales pueden ser responsables de los cambios morfológicos que ocurren en las células,⁽⁷⁶⁾ y que se sabe están involucrados en la reparación del DNA y la integridad estructural, causando directa o indirectamente, muchos de los cambios característicos de la apoptosis.⁽¹⁸⁾ Es posible que la supervivencia de las células que se encuentran con su DNA dañado, y el retraso de estas en experimentar la apoptosis, puedan inducir un incremento en las mutaciones del genoma, y con ello una mayor emergencia de células con proteínas oncogénicas y/o resistencia a los fármacos.⁽⁷⁴⁾

En el presente trabajo fue evaluada la actividad antitumoral, de derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos, en diferentes líneas celulares tumorales de cáncer de cervix (CALO y HeLa), cáncer de colon (SW620 y SW480), y cáncer de mama (MCF-7), usando la técnica del MTT para medir la viabilidad celular. Las estructuras químicas de los derivados de lactonas sesquiterpénicas, y de los compuestos heterocíclicos, son mostradas en la Fig. 1 y 2 respectivamente. Como control positivo del ensayo se empleó el taxol, cuya estructura se muestra en la Fig. 3. Para los compuestos que presentaron una actividad antitumoral considerable en todas las líneas celulares tumorales, fue determinado su valor de IC₅₀.

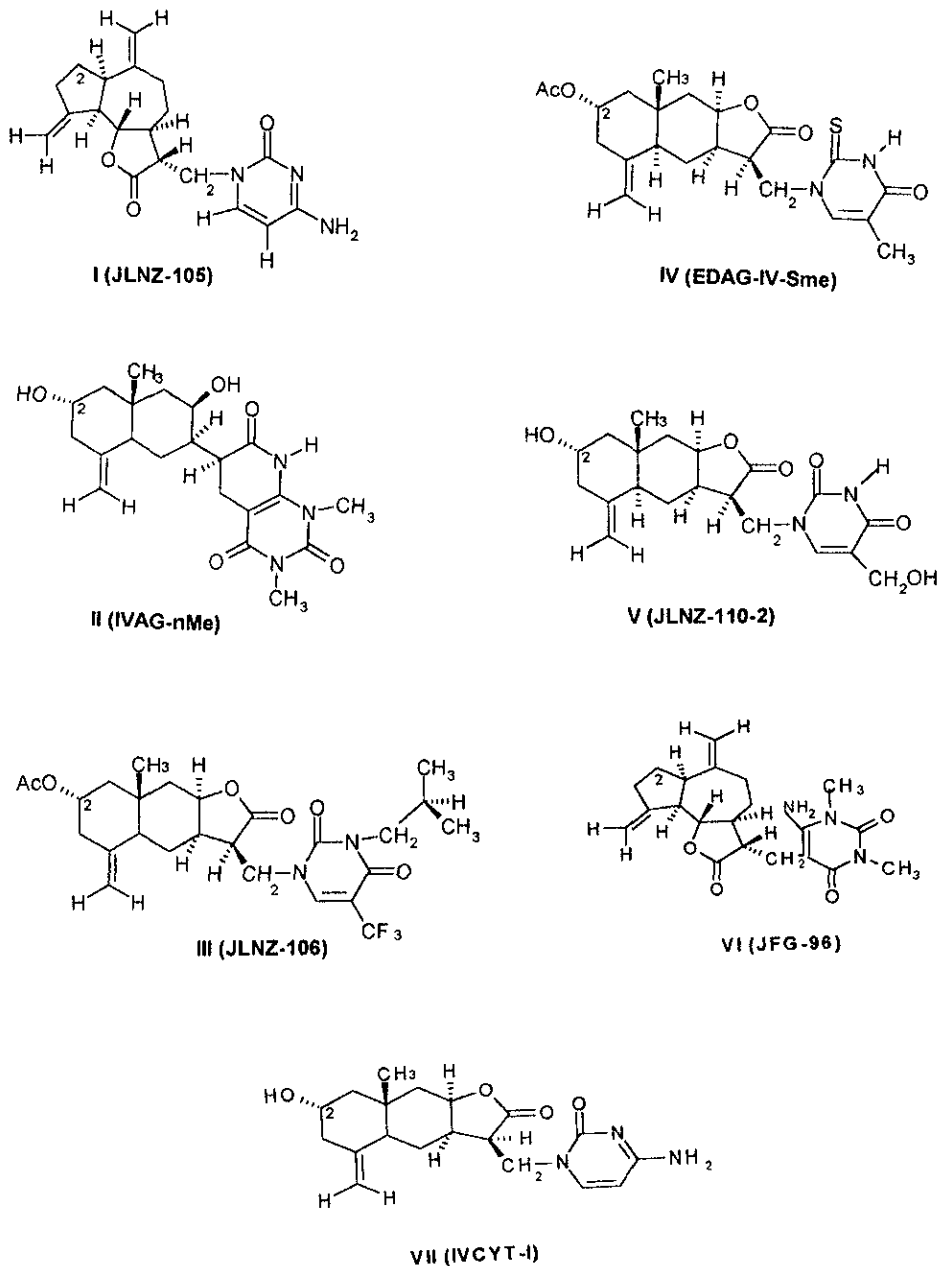
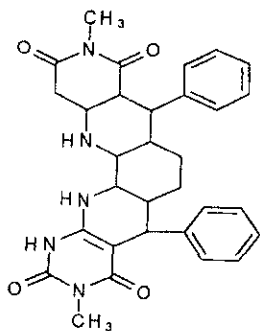
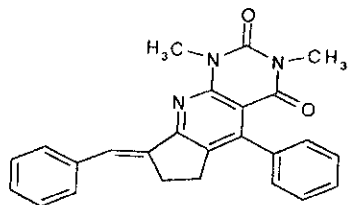


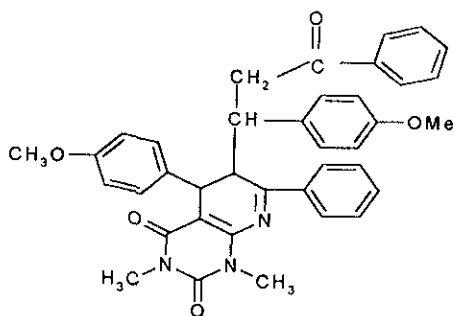
Fig. 1 Estructuras de los derivados de lactonas sesquiterpénicas utilizados



VIII (RDM-V-14)



IX (AG-EDRD-5)



X (RDM-X-5)

Fig. 2 Estructuras de los compuestos heterocíclicos empleados.

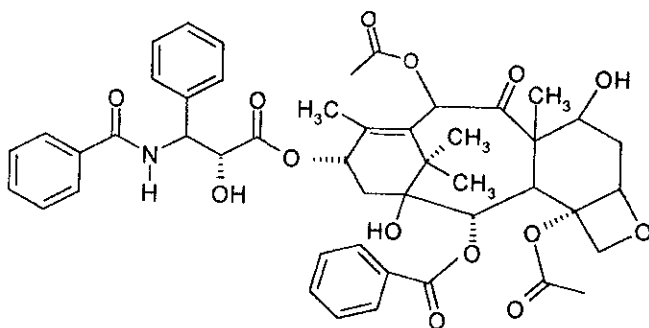


Fig. 3 Estructura del taxol.⁽⁸⁶⁾

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

5.1 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.

CALO: Son células de carcinoma epidermal de cervix humano, fueron aisladas de una paciente mexicana. Esta línea celular ha sido descrita recientemente y se tienen pocos antecedentes.⁽⁷⁸⁾

HeLa: Células de carcinoma epidermal de cervix humano, fueron aisladas de una paciente negra de 31 años de edad. Es la línea celular más ampliamente estudiada.⁽⁷⁹⁾

SW620: Células de adenocarcinoma de colon humano, aisladas de un hombre caucásico de 51 años de edad de grupo sanguíneo A Rh+.⁽⁷⁹⁾

SW480: Células de adenocarcinoma de colon humano, aisladas por A. Leibovitz y colaboradores.⁽⁷⁹⁾

MCF-7: Células de adenocarcinoma de mama humano, presentan ciertas características diferenciales de las células epiteliales de mamífero, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógenos citoplasmicos. Esta línea celular puede contener la información del virus de papiloma tipo B o C.⁽⁷⁹⁾

5.2 TÉCNICAS EMPLEADAS

5.2.1 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS.

Todos los procedimientos se realizan en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Las células se conservan congeladas en nitrógeno líquido.

1.- El criotubo se descongela lentamente, frotando ligeramente con las manos o con un poco de agua.

2.- En una caja petri previamente etiquetada y que contenga el medio de cultivo adecuado para cada línea celular atemperado (ver tabla 1), se deposita el contenido del criotubo, y se agita ligeramente la caja petri para homogeneizar la solución.

3.- La caja se incuba 2-4 horas a 37 °C, 5% CO₂, 99% de humedad, para favorecer la adhesión de las células a la caja petri.

4 - Si al observar al microscopio la caja petri después de pasado el tiempo de incubación, las células se encuentran adheridas, entonces se procede a cambiar el medio de cultivo de la caja petri, y si no hay células adheridas, entonces se desecha el contenido de la caja y se procede a realizar la descongelación de un nuevo criotubo.

5.- Para cambiar el medio de cultivo en la caja petri, primeramente se debe tirar el medio de cultivo contenido en esta por decantación, y después las células adheridas a la caja se lavan con una solución atemperada de PBS-EDTA, la cual también se desecha por decantación, posteriormente se adiciona medio de cultivo fresco adecuado para cada línea celular previamente atemperado.

TABLA 1

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA CADA LÍNEA CELULAR.

LÍNEA CELULAR	MEDIO DE CULTIVO	REFERENCIA
CALO	RPMI complementado	5
HeLa	D-MEM complementado	80, 81
SW620	D-MEM complementado	80
SW480	D-MEM complementado	80
MCF-7	D-MEM complementado	80, 81

5.2.2 MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS.

Todos los procedimientos se realizan en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Las células se mantienen en crecimiento en cajas petri de plástico (desechables), con el medio de cultivo adecuado para cada línea celular, el cual debe cambiarse cada tercer día o según se requiera. Para cambiar el medio de cultivo debe hacerse lo siguiente:

- 1.-El medio que se encuentra en la caja petri se elimina por decantación.
- 2.- Posteriormente las células adheridas en la caja se lavan con una solución atemperada de PBS-EDTA, una o dos veces según la cantidad de detritos observados al microscopio.
- 3.- Finalmente se adiciona medio fresco atemperado correspondiente a cada línea celular, y las células vuelven a incubarse a 37 °C, 5% CO₂, 99% de humedad.

Como las células se adhieren a la superficie de la caja, cuando hay demasiadas en una caja es necesario tomar una pequeña alícuota de ésta y trasladarla a otra caja, esto se realiza de la siguiente forma.

1 - El medio de cultivo que se encuentra, en la caja petri que tiene un crecimiento celular masivo, se desecha por decantación, y la caja se enjuaga con una solución atemperada de PBS-EDTA, la cual se desecha también por decantación.

2.- Se adiciona un volumen adecuado para cubrir la superficie celular adherida a la caja petri, de una solución atemperada de tripsina al 0.05% y se deja actuar durante un periodo de 3 a 5 minutos (hasta que se desprendan las células de la superficie de la caja).

3.- Una vez terminado el período de incubación, debe adicionarse el mismo volumen de medio de cultivo adecuado para cada línea celular, con el fin de neutralizar el efecto de la tripsina sobrante, posteriormente se resuspende la solución con ayuda de una pipeta Pasteur, a fin de favorecer el desprendimiento de las células que aún están adheridas y para homogeneizar la suspensión celular

4.- En cajas petri previamente etiquetadas y con medio de cultivo adecuado a cada línea celular, se coloca un poco del volumen de la suspensión celular y se resuspende nuevamente la solución.

5.- Las cajas petri se incuban a 37 °C, 5% de CO₂ y 99% de humedad relativa y se observan al microscopio

6.- La suspensión celular sobrante se desecha o se congela según se requiera.

Nota: Todo el material biológico utilizado se inactiva con hipoclorito antes de ser desechado en la tarja.

5.2.3 CONGELAMIENTO.

1.- Cuando la línea celular desea guardarse en congelación, las células se desprenden mediante tripsinización, cuando están en un grado de confluencia de 80-95 %, y se hace una suspensión celular con ellas.

2.- Una vez que se tiene la suspensión de células, esta se centrifuga a 2000 r.p.m./5 min.

3.- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 1 mL de medio de congelamiento adecuado para cada línea celular.

4.- La suspensión celular anterior se coloca en criotubos.

5.- Los criotubos se congelan primero a una temperatura de -70°C durante 2 horas, y luego en nitrógeno líquido.

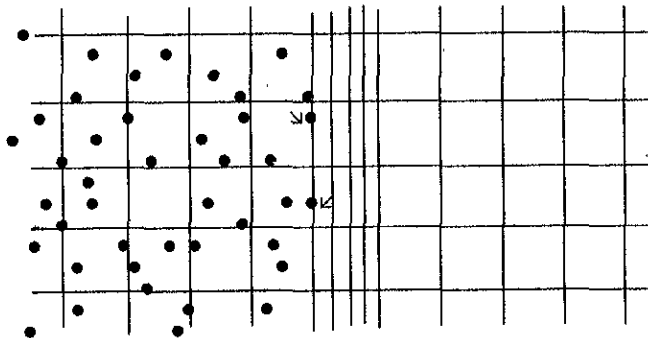
5.2.4 CONTEO DE CÉLULAS.

Las células se cuentan en una cámara de Newbauer de la siguiente manera:

1.- La cámara de Newbauer se limpia muy bien antes de usarse con una solución de etanol al 75%.

2.- De la suspensión celular que se va a contar se toma una pequeña alícuota ($50\ \mu\text{L}$ o menos) y se deposita en la cámara de Newbauer.

3.- La cámara se coloca en el microscopio óptico y se realiza el conteo de las células como se indica a continuación.



Las células que se encuentran dentro de la cuadrícula se cuentan sin problema, pero de las que tocan las líneas, solo son tomadas en cuenta para el conteo, las que están en las líneas que forman una L al revés (\lrcorner), esto con el fin de tener la misma probabilidad de

considerar en el conteo las células que tocan la línea de la cuadrícula, en cada una de las determinaciones.⁽⁸¹⁾

↳ Estas células no se toman en cuenta para el conteo.

· Estas células si son tomadas en cuenta para el conteo.

Como la cámara de Neubauer contiene 8 cuadros grandes como el mostrado anteriormente, se cuentan el total de las células presentes en las 16 cuadrículas de cada cuadro grande, obteniendo así ocho valores (uno de cada cuadro grande). Con los ocho valores obtenidos se realiza un promedio, para determinar el número de células presentes en la suspensión. Los valores obtenidos de cada uno de los 8 cuadros grandes no deben estar muy alejados unos con otros, pues de lo contrario tiene que repetirse el conteo debido a la gran variación entre los resultados obtenidos, lo cual indica falta de homogeneidad en la suspensión celular, o errores en la toma de la muestra para el conteo, por lo cual la suspensión debe volverse a resuspender antes de realizar el nuevo conteo. El número promedio obtenido en el conteo debe multiplicarse por un factor de 1×10^4 , este número representa la cantidad de células presentes en 1 mL de la suspensión celular.⁽⁷³⁾

5.2.5 INICIO DEL CULTIVO CELULAR PARA LA EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

Todos los procedimientos se realizan en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

1.- Las líneas celulares (CALO, HeLa, SW620, SW480 y MCF-7) que fueron utilizadas, para la evaluación de los derivados de lactonas sesquiterpénicas, y los compuestos heterocíclicos, que se encuentran conservadas en nitrógeno líquido, deben descongelarse.

2.- Estas células se mantienen durante una semana en cajas petri, para estabilizar el crecimiento celular y para tener suficiente material biológico para trabajar.

3.- Después del punto anterior se realiza un pase de las células a otra caja petri, la cual se incuba a 37 °C, 5% CO₂, 99% de humedad, durante un periodo aproximado de 48 horas o hasta que esta alcance un 90-95% de confluencia.

4 - Una vez cumplido el punto anterior, se despega la monocapa de células que se forma en las cajas petri, mediante la adición de un volumen adecuado de tripsina 0.05% atemperada, suficiente para cubrir la superficie de la caja petri, después de lo cual la caja se incuba durante 3-5 min.

5.- Posteriormente se adiciona un volumen igual de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, para neutralizar el efecto de la tripsina. La suspensión celular se resuspende, con ayuda de una pipeta Pasteur, despegando las células que aún están adheridas y homogeneizando la suspensión.

6.- De la suspensión celular obtenida en el punto anterior, se hacen diluciones pertinentes para realizar el conteo de células en la cámara de Newbauer. Las diluciones hechas deben ser tales, que el volumen tomado de esta solución para montar el experimento, debe encontrarse entre 50-150 µL para evitar una gran variación en los resultados, y el número de células presentes en este volumen debe ser de $1.2-1.5 \times 10^4$ células.

7.- En condiciones de esterilidad se toma el volumen de la suspensión diluida que contenga el número de células deseado, y se coloca en cada uno de los pozos de una placa de 24 pozos.

8 - Posteriormente se adiciona a cada pozo, el volumen faltante para 1 mL de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular.

9.- La placa se incuba durante 48 horas, que es el tiempo en el que aproximadamente se alcanza la fase de crecimiento exponencial de dichas líneas celulares. El tiempo esta basado en los datos de una curva de crecimiento para cada línea celular realizada con anterioridad en el laboratorio.

5.2.6 COMPUESTOS EMPLEADOS.

5.2.6.1 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Todos los derivados de lactonas sesquiterpénicas se adicionaron a manera de tener una concentración final en cada pozo de 15 μM .

El ensayo de la actividad antitumoral de los derivados de las lactonas sesquiterpénicas, se llevó a cabo por cuadruplicado, usando un control positivo (células tratadas con taxol a una concentración de 0.25 μM), un control negativo (células sin tratamiento), así como un control del disolvente (células tratadas con DMSO)

Derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos.

Se pesó 1 mg de cada compuesto a probar y se disolvió en 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), de esta solución se tomó el volumen adecuado de cada compuesto, a fin de tener en cada pozo una concentración final de 15 μM , y que dicho volumen fuera menor de 2 μL debido al efecto dañino que tiene el DMSO sobre las células, lo cual pudiera interferir con los resultados obtenidos.

Control positivo.

Se partió de una solución "stock" que contenía 1.1 mg de taxol disuelto en 1 mL de DMSO. De esta solución se hizo una dilución 1:10 usando medio de cultivo. La concentración final de taxol obtenida en cada pozo fue de 0.25 μM

Control negativo.

Como control negativo se usaron líneas celulares sin ningún tipo de tratamiento, pero mantenidas bajo las mismas condiciones que el resto de las células.

Control del disolvente.

Como control de disolvente se usó el DMSO. El volumen de este disolvente adicionado en cada pozo, fue igual al volumen mayor de los derivados de las lactonas sesquiterpénicas, compuestos heterocíclicos o del taxol adicionado en los pozos.

Las células se incubaron durante 48 horas después de la adición de los compuestos que se deseaban probar, del taxol y del DMSO, pasado el tiempo de incubación se procedió a medir la viabilidad de las células en cada uno de los pozos, mediante la técnica del MTT.

5.2.7 TÉCNICA DEL MTT PARA MEDIR LA VIABILIDAD CELULAR.

5.2.7.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.

Este ensayo es versátil y cuantitativo, lo que representa una ventaja sobre las técnicas tradicionales usadas para detectar la proliferación y ensayos de citotoxicidad.⁽⁸²⁾

El reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, también conocido como MTT, es un compuesto de color amarillo que al ser reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables en la cadena respiratoria, produce formazán el cual es de color azul.⁽⁸²⁾ El anillo de tetrazolio es reducido en la mitocondria activa, y así la reacción ocurre solo en células vivas, ya que las células muertas son incapaces de reducir el MTT después de 30 minutos de lisis mediada por complemento.⁽⁸²⁾ Esto indica que el ensayo también tiene valor potencial para la medición rápida y cuantitativa de la muerte celular.⁽⁸²⁾ El formazán producido se disuelve completamente en dimetilsulfóxido (DMSO), el cual se ha demostrado que es el disolvente más apropiado para el ensayo,⁽⁸²⁾ el compuesto colorido absorbe a una longitud de onda de 540 nm, la cantidad de células viables es directamente proporcional a dicha absorbancia la cual es estable durante dos horas.^(82, 83) Es importante notar que algunas sustancias (ácido ascórbico y agentes sulfhidrilo), son capaces de reducir

la sal de tetrazolio por acción química directa, mientras otras sustancias (malonato, rotenona, amital, y DCTFG) puede bloquear indirectamente la reducción del MTT mediada por las células, por inhibir tempranamente los pasos de la respiración celular ⁽⁸³⁾

5.2.7.2 PROCEDIMIENTO. ^(84, 85)

- 1.- La suspensión de células contenidas en cada pozo (aproximadamente 1 mL), se colecta en tubos eppendorf con ayuda de una micropipeta y en condiciones de esterilidad, después de 48 h de tratamiento con los compuestos
- 2.- Se adicionan 200 μ L de tripsina 0.05% en cada pozo para despegar la monocapa celular, y se incuba la placa durante 3 minutos.
- 3.- Se recoge el volumen de tripsina resuspendiendo varias veces en cada pozo con ayuda de una micropipeta, para favorecer el desprendimiento de la monocapa. El volumen de cada pozo se coloca en el tubo eppendorf correspondiente.
- 4.- Se adiciona a cada pozo 250 μ L de PBS-EDTA y se incuba la placa durante 5 minutos.
- 5.- Pasado el tiempo de incubación se recoge el volumen en el tubo eppendorf correspondiente, resuspendiendo varias veces en cada pozo para recoger el mayor número de células que aquí se encuentren.
- 6.- Los tubos se centrifugan a 2500 r.p.m./5 min.
- 7.- Se desecha el sobrenadante y se adicionan 200 μ L del medio fresco correspondiente para cada línea celular, el cual debe estar atemperado.
- 8.- Se adiciona a cada tubo 20 μ L de la solución de MTT, resuspendiendo varias veces con ayuda de una micropipeta.
- 9.- Los tubos eppendorf se incuban durante 3 horas (tiempo que tarda en llevarse a cabo la reacción), a 37 °C, 5% CO₂, 99% de humedad.
- 10.- Terminado el tiempo de incubación los tubos se centrifugan a 5000 r.p.m./5 min.

11.- Se eliminan 200 μ L de medio teniendo cuidado de no eliminar el precipitado azul que se forma por efecto de la reducción del MTT.

12.- Se adicionan 500-1000 μ L de DMSO (según la cantidad de precipitado formado), para disolver el precipitado.

13.- Se agita cada tubo eppendorf en un vortex.

14.- Se realiza la lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

15.- De los cuatro valores de densidad óptica obtenidos para cada tratamiento se calcula un promedio (un valor por tratamiento).

16.- Con los valores obtenidos del punto anterior se determina el % de inhibición debida a los compuestos empleados en cada línea celular para ello se usa la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left| 1 - \frac{\text{Abs compuesto}}{\text{Abs control negat}} \right| \times 100$$

17.- Aquellos compuestos que muestren una significativa inhibición del crecimiento celular, igual o mayor al 25 % en todas las líneas celulares empleadas, serán considerados como compuestos con una actividad antitumoral generalizada.

18.- Para los compuestos que presentaron actividad antitumoral, fue calculado el valor de IC_{50} en las líneas celulares HeLa y SW480.

19.- Algunos de los compuestos que no presentar actividad antitumoral, fueron reanalizados siguiendo el mismo protocolo, pero usando una concentración de 25 μ M.

5.2.8 DETERMINACIÓN DE LA IC_{50} .

1.- Las líneas celulares que fueron empleadas para determinar el valor de IC_{50} , se mantuvieron de la misma manera que los cultivos celulares empleados para la evaluación de la actividad antitumoral.

- 2.- El experimento para determinar la IC_{50} se montó de manera similar al experimento para la evaluación de la actividad antitumoral, solo que aquí se empleó una concentración celular en cada pozo de aproximadamente 2×10^4 cels/mL.
- 3.- Los cultivos celulares fueron incubados durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO_2 , y 99% de humedad, previo a la adición de los compuestos.
- 4.- De los compuestos que presentaron actividad antitumoral fueron preparadas soluciones a partir de un "stock" usando como disolvente DMSO de manera que en los pozos se tuvieran como concentraciones finales 12.5, 25, 50, 80 y 100 μM . El volumen final manejado en cada pozo fue de 1000 μL .
- 5.- Los compuestos a las diferentes concentraciones fueron adicionados a los cultivos celulares después de 24 horas de crecimiento, y fueron mantenidos en el cultivo celular durante 72 horas. Se empleó además un control negativo, un control del disolvente y un control positivo de manera similar que en el ensayo para la evaluación de la actividad antitumoral.
- 6.- Una vez pasado el tiempo de exposición de las líneas celulares con los compuestos, se evaluó la viabilidad celular por medio de la técnica del MTT, de manera similar que en la evaluación de la actividad antitumoral.
- 7.- Se determinó el % de inhibición de cada uno de los compuestos a cada una de las concentraciones.
- 8.- Se elaboró una gráfica de % de inhibición contra el logaritmo de la concentración para cada uno de los tratamientos. De estas gráficas se hizo una regresión lineal, y los valores de IC_{50} fueron determinados gráficamente, como la concentración del compuesto que causa un 50% de inhibición del crecimiento celular.

5.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

5.3.1 MEDIOS DE CULTIVO.

La preparación del medio se hace en condiciones de esterilidad y usando una campana de flujo laminar. Para preparar un litro de medio de cultivo se requiere lo siguiente:

MEDIO D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

	Cantidad
Medio D-MEM (GIBCO)	1 sobre para disolver en un volumen final de 1 L
Suplementado con:	
✓ Glutamina (GIBCO)	2 mL
Hepes (SIGMA)	2.2 g
Insulina (LILLY)	10 mL
MEM solución de aminoácidos no esenciales (GIBCO)	10 mL
Suero fetal bovino (GIBCO)	100 mL
Antibiótico-antimicótico (GIBCO)	10 mL
✓ NaHCO ₃ (BAKER)	3.7 g
Piruvato de sodio (GIBCO)	10 mL

✓ Estos suplementos se adicionan solo si el medio de cultivo en polvo no los contiene.

MEDIO RPMI 1640.

	Cantidad.
Medio RPMI (GIBCO)	1 sobre para disolver en un volumen final de 1L
Suplementado con:	
Dextrosa (GIBCO)	2.5 g

✓ NaHCO ₃ (BAKER)	2 g
Suero fetal bovino (GIBCO)	100 mL
Antibiótico-antimicótico (GIBCO)	10 mL
Piruvato de sodio (GIBCO)	10 mL
Aminoácidos no esenciales (GIBCO)	10 mL

✓ Este suplemento se adiciona solo si el medio de cultivo en polvo no lo contiene.

- 1.- Disolver el contenido de un sobre de medio D-MEM o RPMI en 700 mL de agua desionizada.
- 2.- Adicionar todos los suplementos excepto el suero fetal bovino (SFB). La solución se agita hasta disolver completamente de las sales.
- 3.- Ajustar el pH a 7.4 ± 0.3 .
- 2.- Aforar la solución anterior a un volumen de 900 mL con agua desionizada.
- 3.- Esterilizar la solución por filtración con membrana millipore de 0.45μ .
- 4.- Completar el medio con SFB a manera que se vaya utilizando
- 5.- Como control de contaminación bacteriana es recomendable incubar una alícuota de medio de cultivo filtrado, a 37°C , 5% CO₂, 99% de humedad durante 48 horas. Terminado el período de incubación debe observarse al microscopio.
- 6.- Los medios de cultivo se conservan en refrigeración.

5.3.2 MEDIOS DE CONGELAMIENTO

MEDIO A. (Para las líneas celulares HeLa, SW480, SW620 y CALO).

- 1.- Adiciona al medio de cultivo adecuado para cada línea celular sin complementar con suero fetal bovino, 20% v/v de este último.
- 2.- Adiciona a la solución anterior 15% v/v de glicerol estéril.
- 3.- Guarda la solución anterior en recipientes estériles y se congelaría a -20°C .

4.- Cuando sea requerido, el medio debe descongelarse y utilizarse tan pronto como sea posible.

MEDIO B. (Para la línea celular MCF-7).

Para células más exigentes en cuanto a requerimientos nutricionales como es el caso de las células MCF-7 se utiliza el siguiente medio de congelamiento.

Componentes.	Cantidad.
Suero Fetal Bovino inactivado	92 %
Dimetilsulfóxido (DMSO)	8 %

De igual manera la solución anterior se guarda en recipientes estériles y se congela a -20°C .

5.3.3 SOLUCIÓN DE PBS-EDTA.

Para preparar un litro de solución.

Componentes.	Cantidad.
NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	0.24 g
Na_2HPO_4	1.44 g
KCl	0.2 g
EDTA	0.372 g
Agua desionizada c.b.p.	1 L

- 1.- Disolver las sales en 900 mL de agua desionizada.
- 2.- Ajustar el pH a 7.4 (con NaOH o HCl).
- 3.- Aforar a 1L, con agua desionizada.
- 4.- Alicuotar en varios recipientes limpios.
- 5.- Esterilizar en autoclave a 15 lb/in^2 durante 15 minutos.

5.3.4 SOLUCIÓN DE MTT.

Para preparar 10 mL de la solución

Reactivos	Cantidad
Sal de bromuro de tetrazolio	50 mg
Solución salina isotónica	10 mL

- 1 - Disolver la sal de tetrazolio en la solución salina isotónica (evitar el contacto del MTT con la piel, pues es tóxico) usar guantes y cubrebocas
- 2.- Esterilizar la solución por filtración en membrana millipore de 0.45 μ .
- 3.- Envolver con papel aluminio el recipiente que contiene la solución de MTT para protegerla de la luz
- 4.- Almacenar en refrigeración a 4°C.

Nota: Una vez preparada la solución de MTT permanece estable por un período de un mes. Pasado este tiempo la solución no debe ser utilizada.

5.3.5 SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA

Para preparar 10 mL de la solución

Reactivos.	Cantidad.
NaCl	85 mg
Agua desionizada c b. p.	10 mL

- 1.- Disolver la sal en el agua desionizada.
- 2.- Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave a 15 lb/in², durante 15 minutos
- 3.- Guardar la solución a temperatura ambiente o en refrigeración.

5.3.6 SOLUCIÓN DE TRIPSINA 0.05%.

Para preparar un litro de solución.

Componentes	Cantidad
Tripsina	0.5 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.4 g
Dextrosa	1.0 g
NaHCO ₃	0.2 g
Agua desionizada estéril c.b.p	1 L

- 1.- Pesar las cantidades indicadas y disolverlas en un volumen pequeño de agua desionizada.
- 2.- Llevar a un volumen final de un litro con agua desionizada.
- 3.- Esterilizar por filtración con membrana millipore 0.45 μ .
- 4.- Preparar alícuotas de la solución y guardarlas en el congelador.

5.3.7 SOLUCIÓN DE ETANOL AL 75%.

Para preparar un litro de solución

- 1.- Medir 750 mL de etanol absoluto.
- 2.- Aforar el etanol a un volumen de 1000 mL usando para ello agua destilada.
- 3.- Mezclar muy bien la solución.
- 4.- Hacer alícuotas de la solución o guardar en un contenedor de un litro y mantenerlas a *temperatura ambiente*.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados que se muestran representan la media \pm la desviación estándar, de cuatro determinaciones realizadas para cada condición (línea celular, tratamiento y concentración de los compuestos). Para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los valores de % de inhibición encontrado para cada compuesto, con respecto al control, se usó un paquete de cómputo (PAQUEST) que utiliza la prueba de análisis de varianza ANOVA

6. RESULTADOS.

Evaluación de la actividad antitumoral. Los resultados del efecto antiproliferativo, del dimetilsulfóxido que fue el disolvente empleado en los ensayos, del taxol usado como control positivo, así como el de los derivados de lactonas sesquiterpénicas (I-VII) y compuestos heterocíclicos (VIII-X) probados, se resumen en la tabla 2.

Para preparar las soluciones de los *derivados de lactonas sesquiterpénicas* y compuestos heterocíclicos, se utilizó como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), el cual en altas concentraciones y en base a resultados previos obtenidos en el laboratorio, se sabe tiene efecto antiproliferativo por daño a las células. Con el objeto de conocer el efecto de este disolvente se incluyó en el experimento un control, en el cual el DMSO fue administrado a cada línea celular, en un volumen igual al volumen máximo administrado en los experimentos efectuados para evaluar a las nuevas moléculas (volúmenes de 0.6 μ L a 1.8 μ L). Como se observa en la Fig 4, el DMSO tiene un efecto antiproliferativo despreciable, en todas las líneas celulares empleadas

Como control positivo de los experimentos se usó taxol a una concentración de 0.25 μ M. La inhibición del crecimiento celular inducida por este compuesto, en las diferentes líneas celulares tiene un intervalo de aproximadamente 20-55 %, siendo la línea celular CALO la más sensible y la SW480 la más resistente, al tratamiento con este compuesto (Fig. 5).

TABLA 2

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE NUEVAS MOLÉCULAS PROBADAS EN
DIFERENTES LÍNEAS CELULARES TUMORALES**

COMPUESTOS	CALO	HeLa	SW620	SW480	MCF-7
DMSO 100%	4.2 ± 3.7	1.8 ± 1.7	1.0 ± 3.1	-1.5 ± 2.4	4.0 ± 2.8
PAFOL (0.25 μM)	53.3 ± 1.7	38.2 ± 1.8	44.0 ± 0.9	20.0 ± 1.9	40.9 ± 3.5
I (JLNZ-105)	10.7 ± 4.1	0.9 ± 4.1	1.0 ± 4.7	3.6 ± 1.3	7.3 ± 4.6
II (IVAG-nMe)	11.7 ± 0.7	5.2 ± 3.8	1.8 ± 1.6	3.0 ± 4.1	1.5 ± 3.1
[REDACTED]					
V (JLNZ-110-2)	12.4 ± 0.5	7.4 ± 2.0	-5.2 ± 0.6	-1.6 ± 1.9	11.2 ± 4.1
VI (JFG-96)	3.4 ± 0.9	8.0 ± 3.5	15.2 ± 4.8	4.7 ± 3.7	12.8 ± 1.2
VII (IVCYT-1)	4.5 ± 2.6	-2.3 ± 2.4	1.9 ± 4.6	1.3 ± 1.5	6.5 ± 1.4
VIII (RDM-V-14)	6.6 ± 0.4	-4.2 ± 4.4	7.2 ± 2.8	11.6 ± 1.2	5.0 ± 2.1
IX (AG-EDRD-5)	5.6 ± 3.6	-1.6 ± 0.1	9.2 ± 3.5	12.7 ± 3.9	8.7 ± 2.0
X (RDM-X-5)	14.5 ± 2.4	2.9 ± 3.6	10.3 ± 3.6	4.6 ± 4.0	7.2 ± 3.0

Cada una de las líneas celulares fue incubada con los derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos a una concentración de 15 μM, durante un periodo de 48 horas, una vez que las células habían alcanzado la fase de crecimiento exponencial

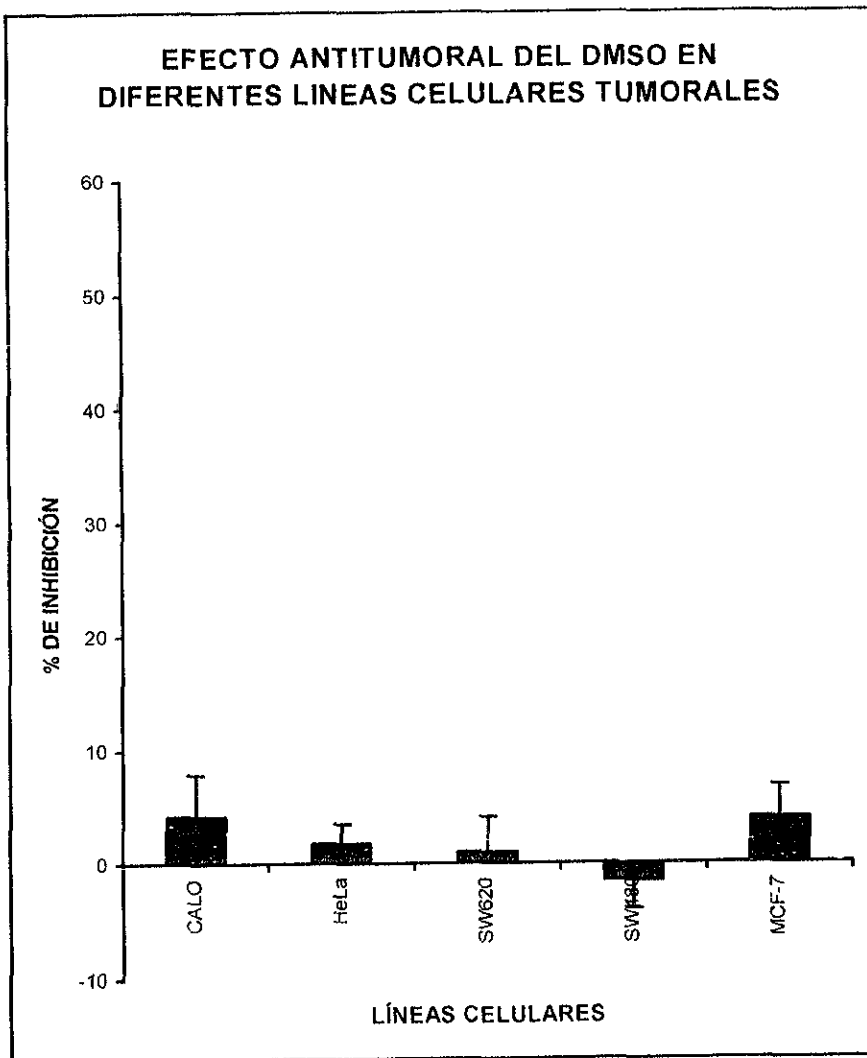


Fig. 4 Efecto antiproliferativo del dimetilsulfóxido frente a diferentes líneas celulares tumorales. El DMSO fue adicionado al 100%, cuando el cultivo celular tenía 48 h de crecimiento, y se mantuvo en el medio de cultivo durante las siguientes 48 h. El volumen administrado del DMSO se encuentra en un intervalo de 0.6 a 1.8 μ L.

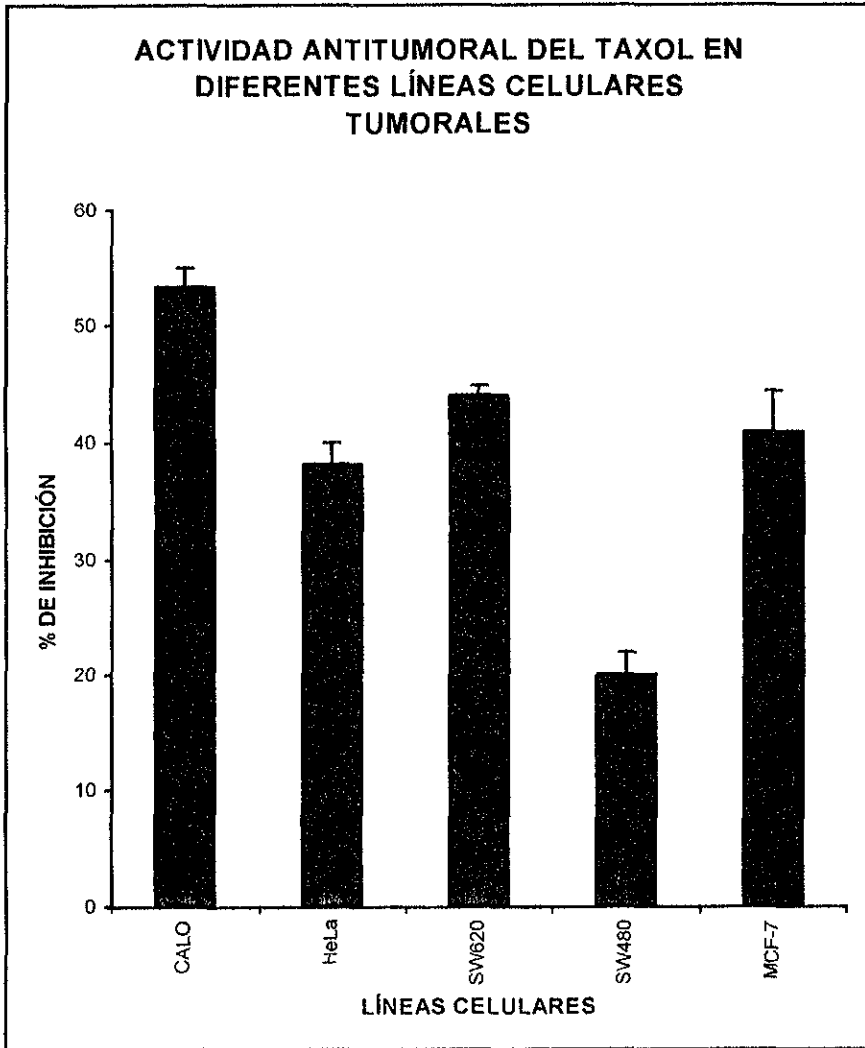


Fig. 5 Actividad antitumoral del taxol usado como control positivo en los experimentos, a una concentración de 0.25 μ M. El taxol se adicionó a cada línea celular después de 48 h de crecimiento, y las líneas celulares fueron tratadas con este compuesto durante las siguientes 48 h

Cuando la línea celular CALO (carcinoma de cervix), fue tratada con los derivados de lactonas sesquiterpénicas (I-VII), se observó que solo los compuestos III y IV presentaron una inhibición del crecimiento celular de 35.4 % y 37.4 % respectivamente, sin existir una diferencia significativa, entre los valores de inhibición producidos por estos dos compuestos, mientras que el resto de los compuestos presentó un efecto antiproliferativo no considerable. De los compuestos heterocíclicos probados (VIII-X) en esta línea celular, se observa que ninguno de ellos presenta un efecto antiproliferativo significativo (Fig. 6).

La línea celular HeLa (adenocarcinoma de cervix), la cual se sabe es muy resistente a la acción de algunos fármacos antitumorales, fue sensible únicamente a los compuestos III y IV, que pertenecen a los derivados de lactonas sesquiterpénicas, con una inhibición del crecimiento de 38.2% y 47.1 % respectivamente, mientras que con los demás compuestos incluyendo los compuestos heterocíclicos, la inhibición fue irrelevante o prácticamente nula (Fig. 7).

Para las líneas celulares de cáncer de colon, los resultados obtenidos muestran que en las células SW620, los derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV son los únicos que presentaron una actividad antiproliferativa considerable, con un intervalo de inhibición del crecimiento de 33-37 % aproximadamente, sin haber diferencias estadísticamente significativa de la inhibición producida por estos dos compuestos, mientras que el resto de los compuestos incluyendo a los compuestos heterocíclicos, presentaron actividad antiproliferativa no considerable o despreciable (Fig. 8).

De los derivados de lactonas sesquiterpénicas probados en la línea celular SW480 (cáncer de colon), los compuestos III y IV nuevamente fueron los únicos que mostraron una considerable actividad antiproliferativa de 27.1 % y 29.6 % respectivamente, sin existir tampoco ninguna diferencia estadística la inhibición del crecimiento producida por ambos compuestos, mientras que de los compuestos heterocíclicos el VIII y IX presentaron solo una ligera actividad inhibitoria del crecimiento celular, con un intervalo de inhibición del crecimiento promedio de 11-13% aproximadamente, sin existir tampoco una diferencia estadísticamente significativa entre la actividad inhibitoria de estos dos compuestos (Fig 9).

Finalmente para la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama, solo los compuestos lactónicos III y IV, mostraron una actividad antitumoral considerable con valores de 46.2 % y 42.5 % respectivamente, mientras que el resto de los compuestos incluyendo a los compuestos heterocíclicos presentaron una inhibición no considerable (Fig. 10).

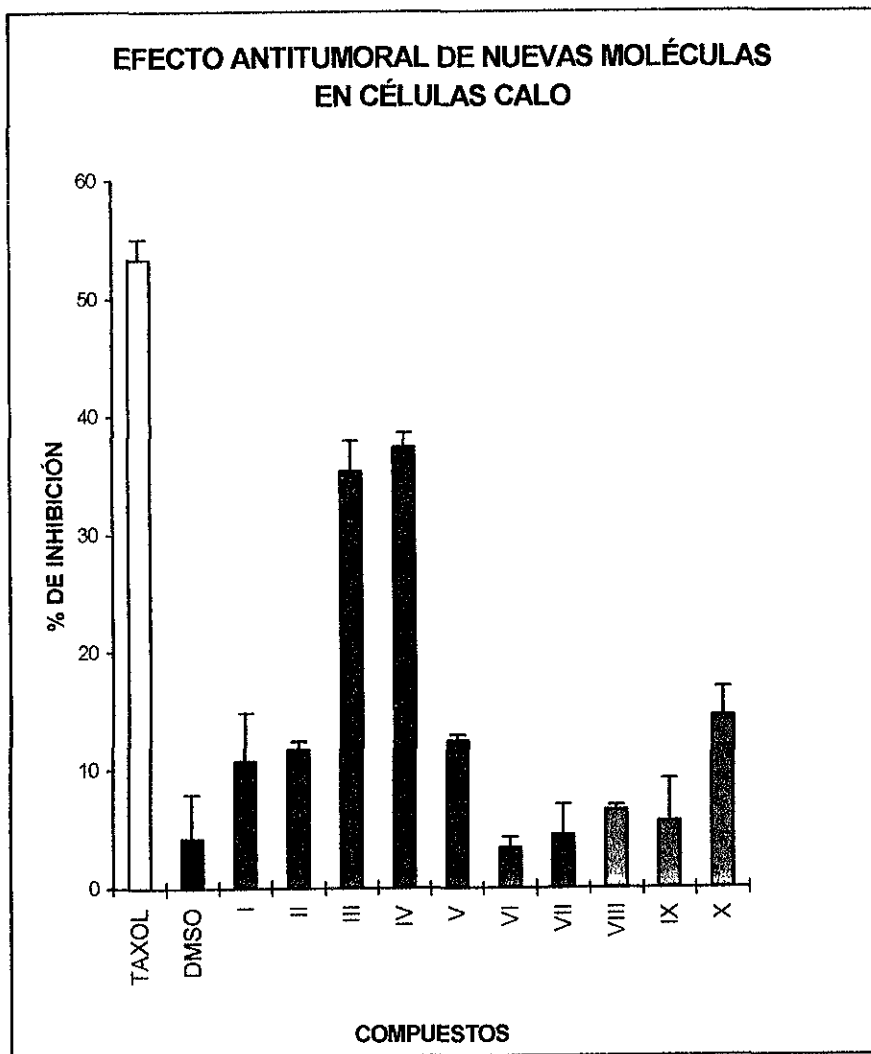


Fig. 6 Inhibición del crecimiento de la línea celular CALO frente al tratamiento con nuevas moléculas, probadas a una concentración de 15 μ M, usando como disolvente DMSO. A las 48 h de crecimiento, las células fueron tratadas con los compuestos durante las siguientes 48 h. Los compuestos I-VII son derivados de lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos VIII-X son compuestos heterocíclicos.

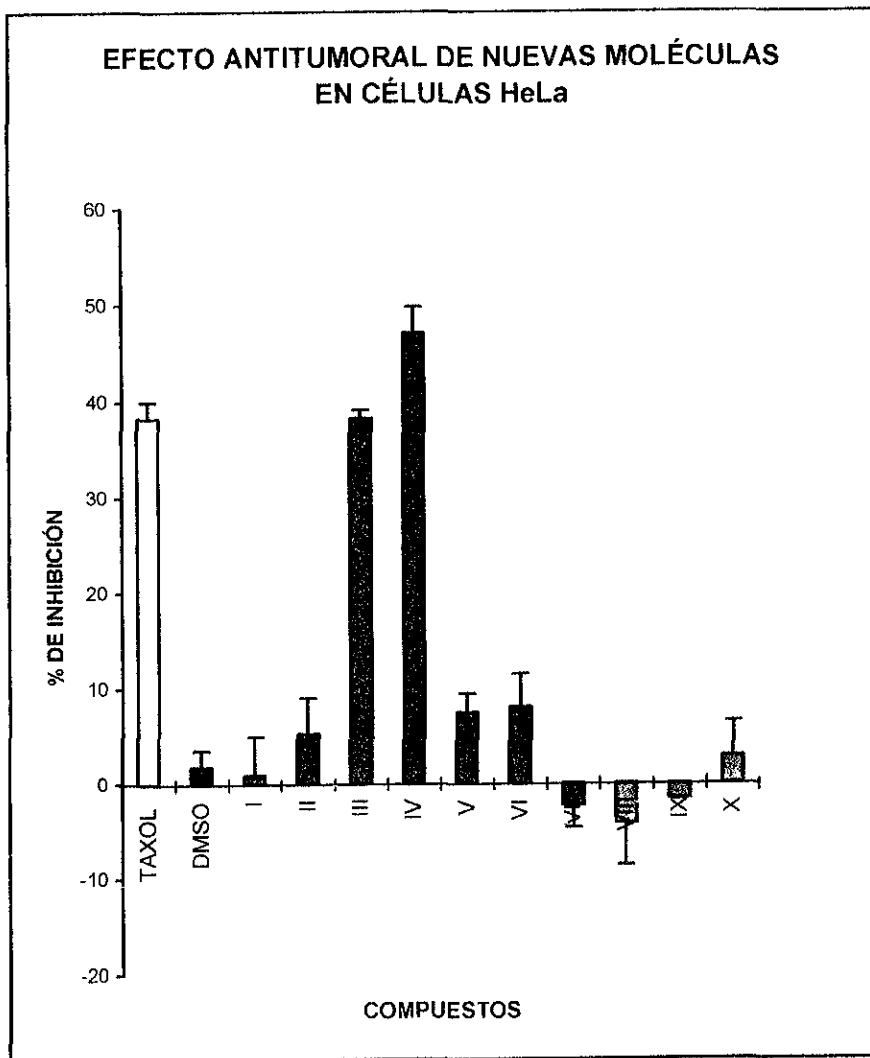


Fig. 7 Inhibición del crecimiento de las células HeLa frente al tratamiento con nuevas moléculas, probadas a una concentración de 15 μ M, usando como disolvente DMSO. A las 48 h de crecimiento, las células fueron expuestas a los compuestos durante 48 h. Los compuestos I-VII son derivados de lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos VIII-X son heterocíclicos.

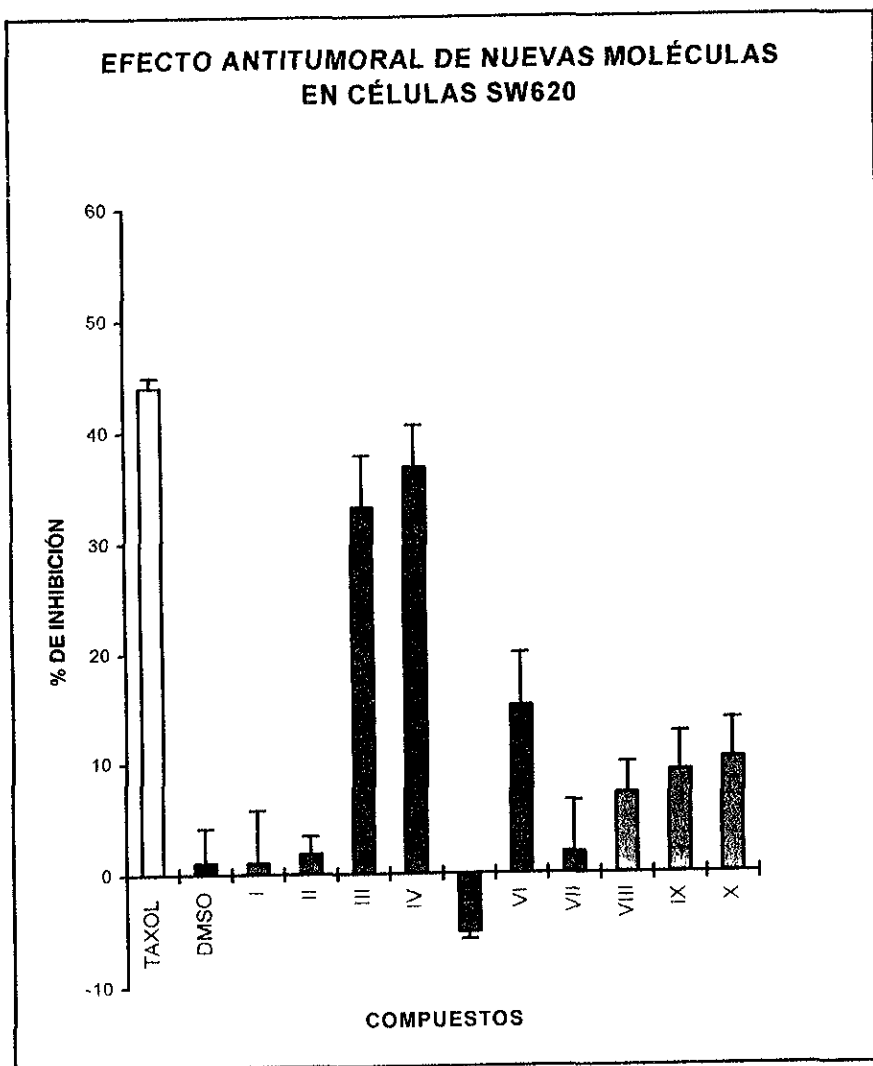


Fig. 8 Efecto inhibitorio del crecimiento de nuevas moléculas probadas a una concentración de 15 μM , en células SW620. Para preparar las soluciones se usó como disolvente DMSO. A las 48 h de crecimiento, las células fueron expuestas con los compuestos durante 48 h. Los compuestos I-VII son derivados de lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos heterocíclicos son VIII-X.

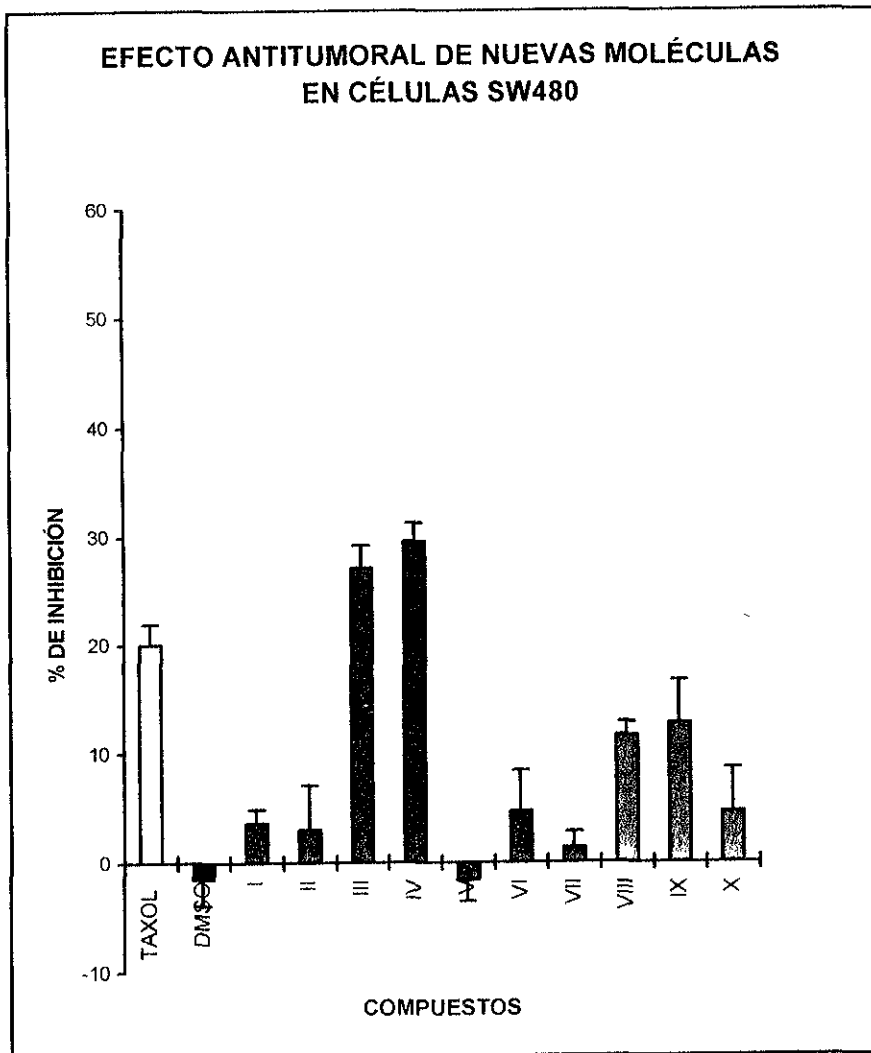


Fig. 9 Inhibición del crecimiento de la línea celular SW480 tratadas con nuevas moléculas, probadas a una concentración de 15 μ M, usando como disolvente DMSO. A las 48 h de crecimiento, las células fueron expuestas a los compuestos durante las siguientes 48 h. Los compuestos I-VII corresponden a derivados de lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos heterocíclicos son VIII-X.

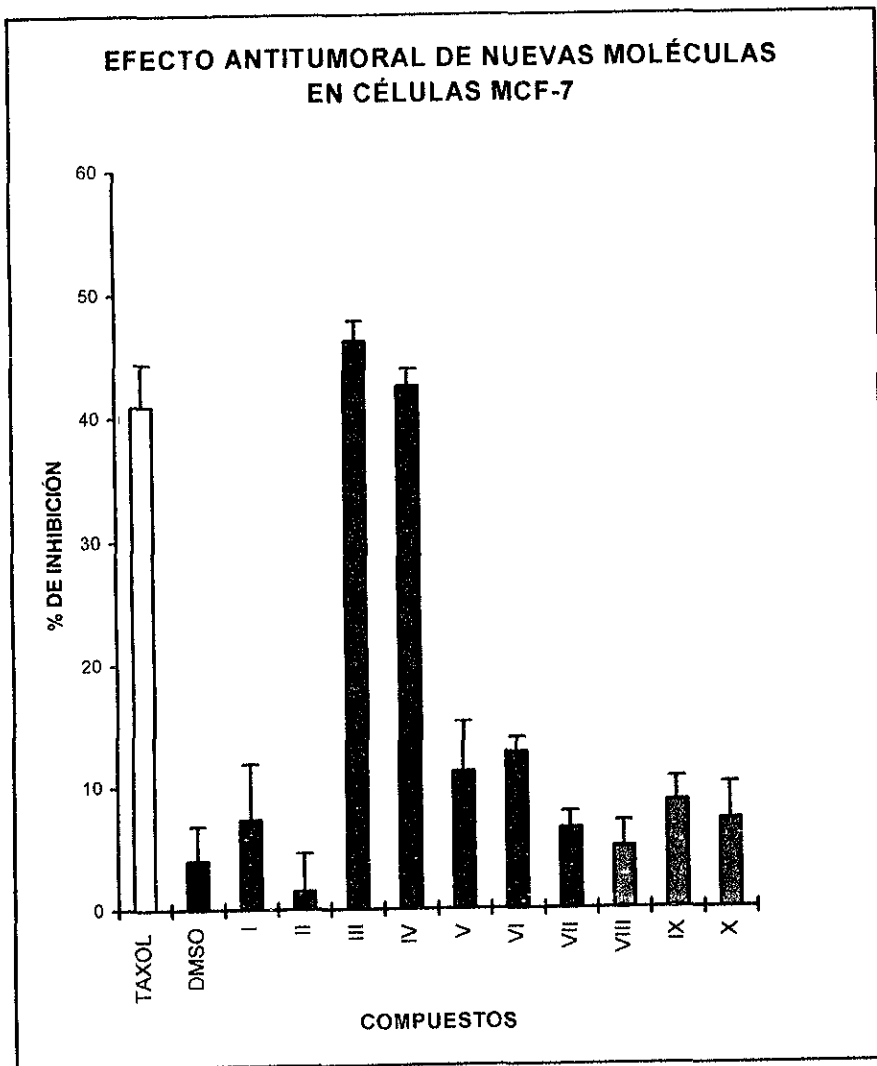


Fig. 10 Inhibición del crecimiento de las células MCF-7 frente a nuevas moléculas, probadas a una concentración de 15 μM , usando como disolvente DMSO. A las 48 h de crecimiento, las células fueron expuestas a los compuestos durante las siguientes 48 h. Los compuestos I-VII son derivados de lactonas sesquiterpénicas. Los compuestos VIII-X son compuestos heterocíclicos.

El intervalo de inhibición del compuesto III, va de aproximadamente 27-46%, en donde la línea celular MCF-7 es la más sensible y las células SW480 las más resistentes al tratamiento (Fig. 11) Para el compuesto IV la actividad inhibitoria del crecimiento celular, se encuentra en un intervalo de aproximadamente 30-47 %, siendo la línea celular HeLa la más sensible al tratamiento y las más resistentes nuevamente son las células SW480 (Fig 12).

Analizando los índices lactona/taxol calculados para los compuestos III y IV se observa que estos compuestos, a una concentración de 15 μM tiene una actividad antiproliferativa igual o ligeramente mayor, a la presentada por el taxol a una concentración de 0.25 μM , en las células HeLa, SW480 y MCF-7, mientras que en las células CALO y SW620, los derivados de lactonas sesquiterpénicas presentan una actividad inhibitoria menor a la presentada por el taxol (Tabla 3)

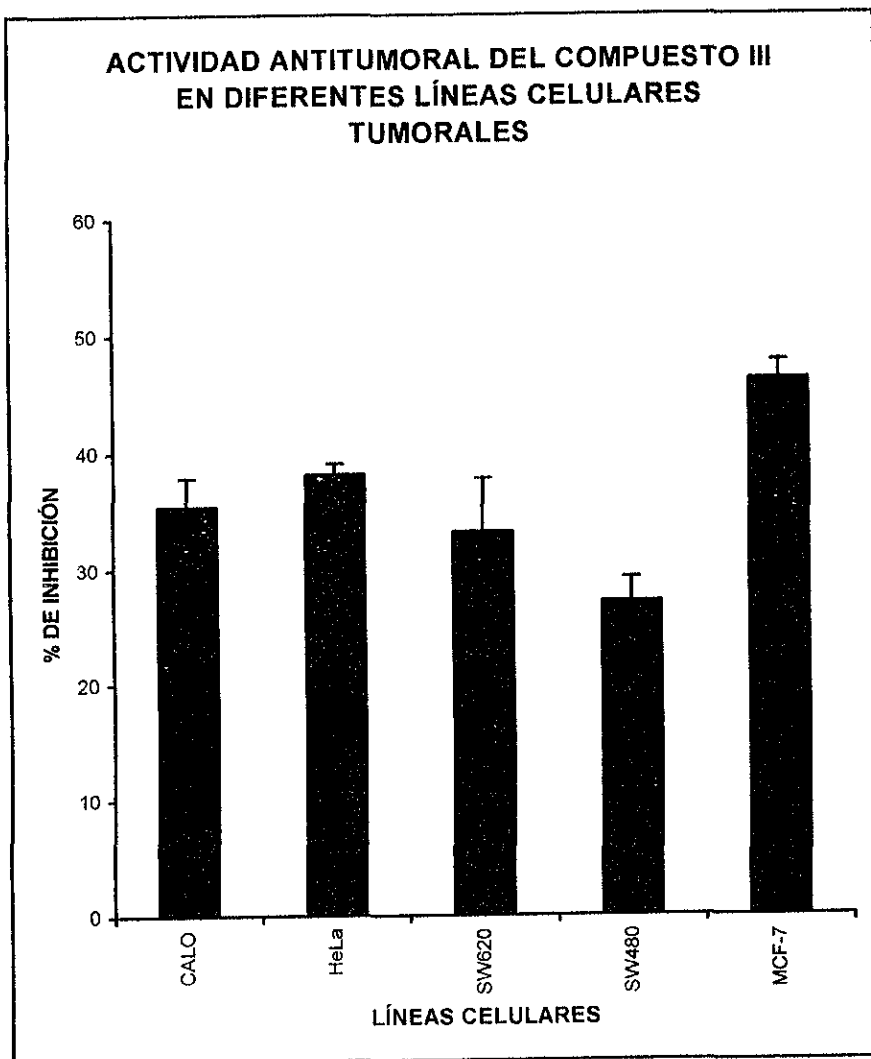


Fig. 11 Actividad antitumoral del derivado de lactonas sesquiterpénicas III (JLNZ-106) en las diferentes líneas celulares usadas, probado a una concentración de 15 μ M usando DMSO como disolvente. El compuesto se adicionó a cada línea celular después de 48 h de crecimiento, y las líneas celulares fueron tratadas con el compuesto durante 48 h.

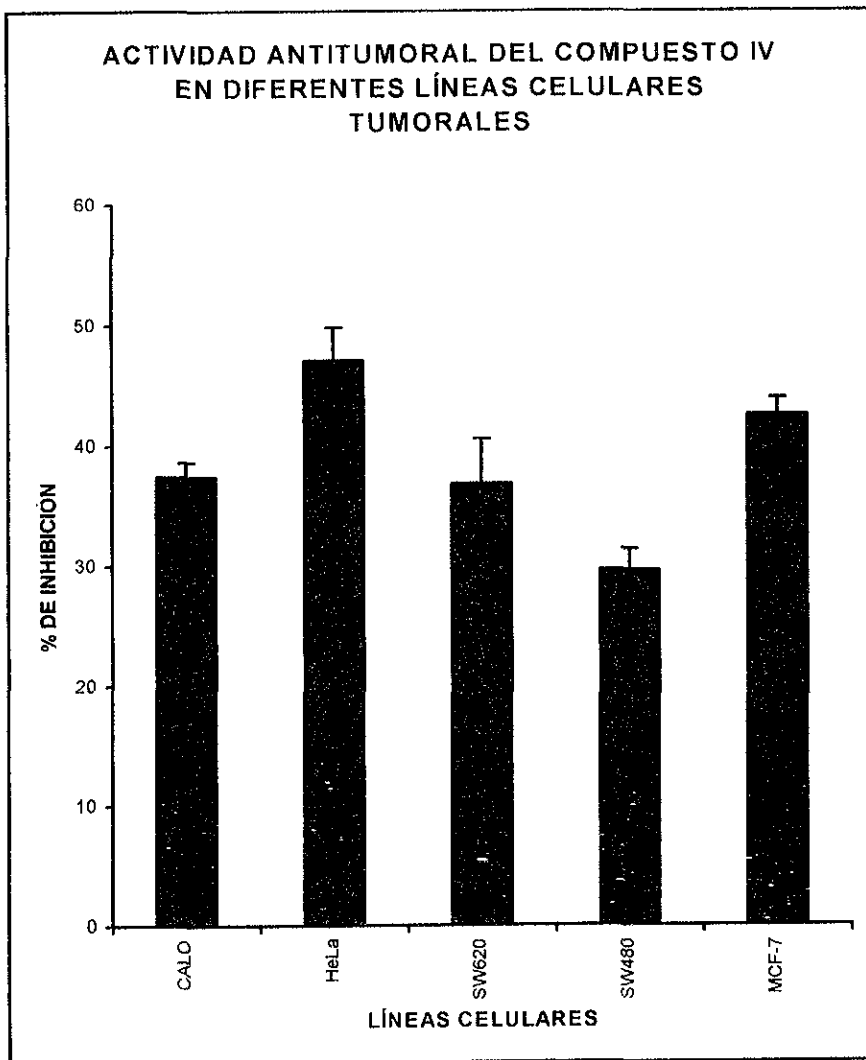


Fig. 12 Actividad antitumoral del compuesto IV (EDAG-IV-SMe) a una concentración de 15 μ M, usando como disolvente DMSO, en las diferentes líneas celulares empleadas. Las líneas celulares fueron tratadas con el compuesto durante 48 h, y el compuesto se administró a cada línea celular en la fase exponencial de crecimiento a las 48 h

TABLA 3
INDICE LACTONA/TAXOL

	CALO	HeLa	SW620	SW480	MCF-7
COMPUESTO III	0.66	1.00	0.75	1.36	1.03
COMPUESTO IV	0.70	1.24	0.84	1.48	1.13

Se calculó el cociente de la relación derivado de lactona sesquiterpénica / taxol, para determinar la eficacia de los compuestos lactónicos III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe) con respecto al taxol

Por su parte los compuestos heterocíclicos (VIII, IX y X), probados a una concentración de 15 μ M, muestran una ligera actividad antitumoral, frente a algunas de las líneas celulares empleadas, mientras que en otras el efecto antiproliferativo es prácticamente nulo.

Debido a que ninguno de los compuestos heterocíclicos probados a una concentración de 15 μ M, mostró un efecto inhibitorio del crecimiento en todas las líneas celulares empleadas, se decidió probarlos a una concentración de 25 μ M. En este experimento se observó que el efecto antiproliferativo del compuesto VIII, se hace nulo en las células CALO, mientras que en el resto de las líneas celulares, permanece prácticamente inalterado con el aumento de la concentración. Al aumentar la concentración del compuesto heterocíclico IX se aumenta ligeramente la actividad inhibitoria, pero solo en las células SW620. En el caso del compuesto heterocíclico X, se ve un aumento en la actividad inhibitoria del crecimiento con el aumento de la concentración en las células SW480, disminuyendo dicho efecto en las células SW620, mientras que en las líneas celulares CALO y MCF-7 dicha actividad permanece prácticamente sin cambio (datos no mostrados)

Determinación de los valores de IC₅₀. De los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antitumoral, se observa que solo los derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV, mostraron una actividad antitumoral considerable en todas las líneas celulares empleadas. Posteriormente se pensó en investigar la potencia de los compuestos III y IV, a través de su valor de IC₅₀, en las líneas celulares HeLa y SW480. Para la evaluación de la IC₅₀ los compuestos III y IV fueron probados en un amplio intervalo de concentraciones, desde una concentración de 12.5 μM hasta de 80 μM. El período de exposición con los compuestos fue de 72 horas. Las actividades inhibitorias del crecimiento celular de los derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV, probados en las líneas celulares HeLa y SW480 a diferentes concentraciones, se resumen en las tablas 4 y 5 de manera respectiva para cada línea celular. Los valores de IC₅₀ obtenidos para cada uno de los compuestos, en cada una de las líneas celulares empleadas se muestran en la tabla 6.

TABLA 4

EFFECTO ANTITUMORAL DE LOS COMPUESTOS III Y IV EN LÍNEA CEULAR HeLa

CONCENTRACIÓN (μM)	COMPUESTO III	COMPUESTO IV
12.5	46.6 ± 2.5	26.9 ± 5.0
25	56.3 ± 2.7	43.9 ± 1.6
50	64.8 ± 1.6	67.2 ± 1.7
80	76.2 ± 0.2	75.9 ± 0.2
100	78.4 ± 0.9	76.0 ± 1.2
TAXOL 0.25 μM	71.2 ± 1.0	

Las células HeLa fueron incubadas a las 24 horas de crecimiento con los compuestos III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe) a las diferentes concentraciones durante un período de 72 h

TABLA 5**EFEECTO ANTITUMORAL DE LOS COMPUESTOS III Y IV EN LÍNEA CELULAR SW480**

CONCENTRACIÓN (μM)	COMPUESTO III	COMPUESTO IV
12.5	30.3 ± 4.2	20.6 ± 2.0
25	42.2 ± 1.9	30.1 ± 1.9
50	45.5 ± 1.0	42.2 ± 1.8
80	50.0 ± 1.8	49.2 ± 4.6
100	53.2 ± 1.9	54.6 ± 3.8
TAXOL $0.25 \mu\text{M}$	41.0 ± 1.5	

A las 24 h de crecimiento las células SW480 fueron incubadas con cada una de las concentraciones de los derivados de lactonas sesquiterpénicas III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe). El período de exposición con los compuestos fue de 72 h.

TABLA 6**VALORES DE IC_{50} DE LOS COMPUESTOS III Y IV**

LÍNEA CELULAR	COMPUESTO III	COMPUESTO IV
HeLa	$16.4 \mu\text{M}$	$30.3 \mu\text{M}$
SW480	$73.5 \mu\text{M}$	$80.4 \mu\text{M}$

Los valores de IC_{50} para los compuestos III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe), fueron determinados incubando cada línea celular después de 24 h de crecimiento con diferentes concentraciones de los compuestos ($12.5 \mu\text{M}$ – $100 \mu\text{M}$), durante 72 h.

En la línea celular HeLa los efectos antiproliferativos de los compuestos III y IV, son dependientes de la concentración hasta 80 μM , después de esta concentración la actividad antiproliferativa permanece sin cambio. El compuesto III produce mayor inhibición del crecimiento que el compuesto IV, a concentraciones menores de 25 μM en esta línea celular, sin embargo a intervalos de concentración mayores y hasta 100 μM , ambos derivados de lactonas sesquiterpénicas presentan una actividad inhibitoria similar (Fig. 13).

Los valores de IC_{50} presentados por los compuestos III y IV son 16.4 μM y 30.3 μM respectivamente para las células HeLa. De acuerdo a los valores de IC_{50} , el compuesto III (Fig. 14) es más potente para inhibir el crecimiento celular que el compuesto IV (Fig. 15), en esta línea celular.

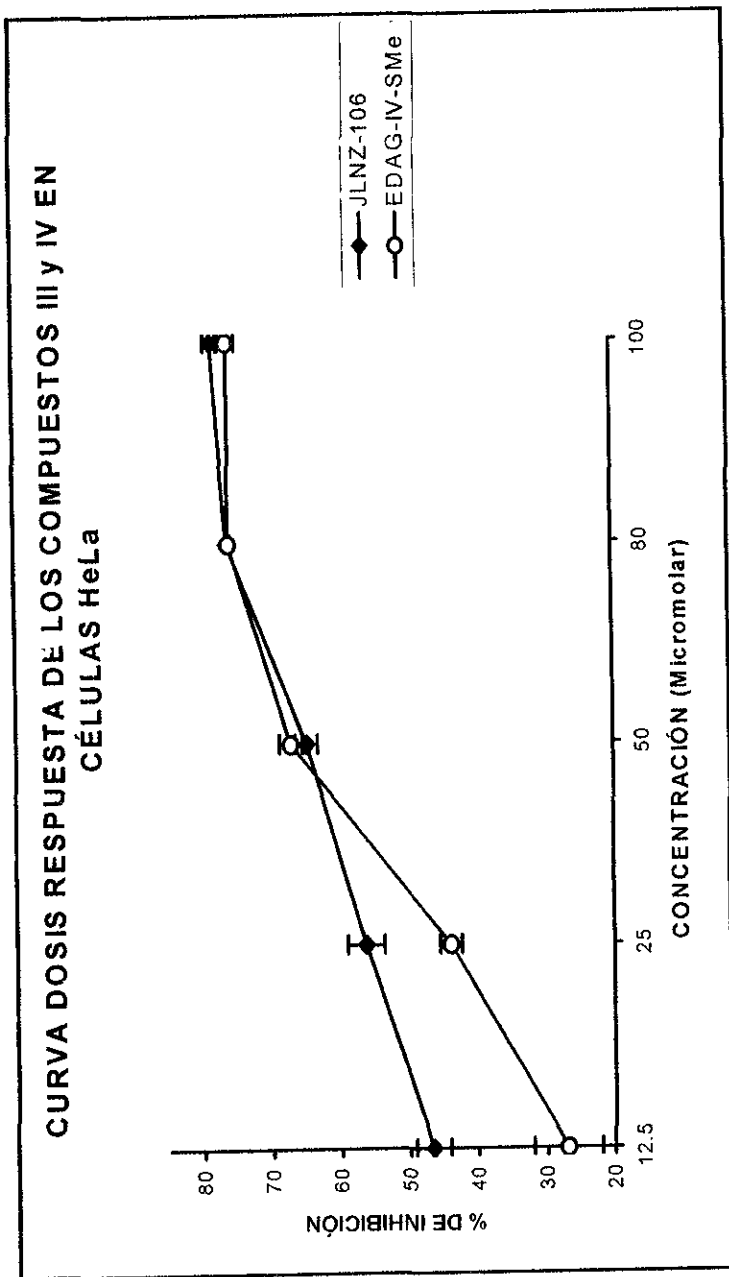


Fig. 13 Curva dosis respuesta de los derivados de lactonas sesquiterpénicas III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe), probados a diferentes concentraciones micromolares en las células HeLa durante un periodo de 72 h. Los compuestos fueron adicionados a la 24 h de crecimiento de la línea celular. Para preparar las diferentes concentraciones se usó DMSO como disolvente.

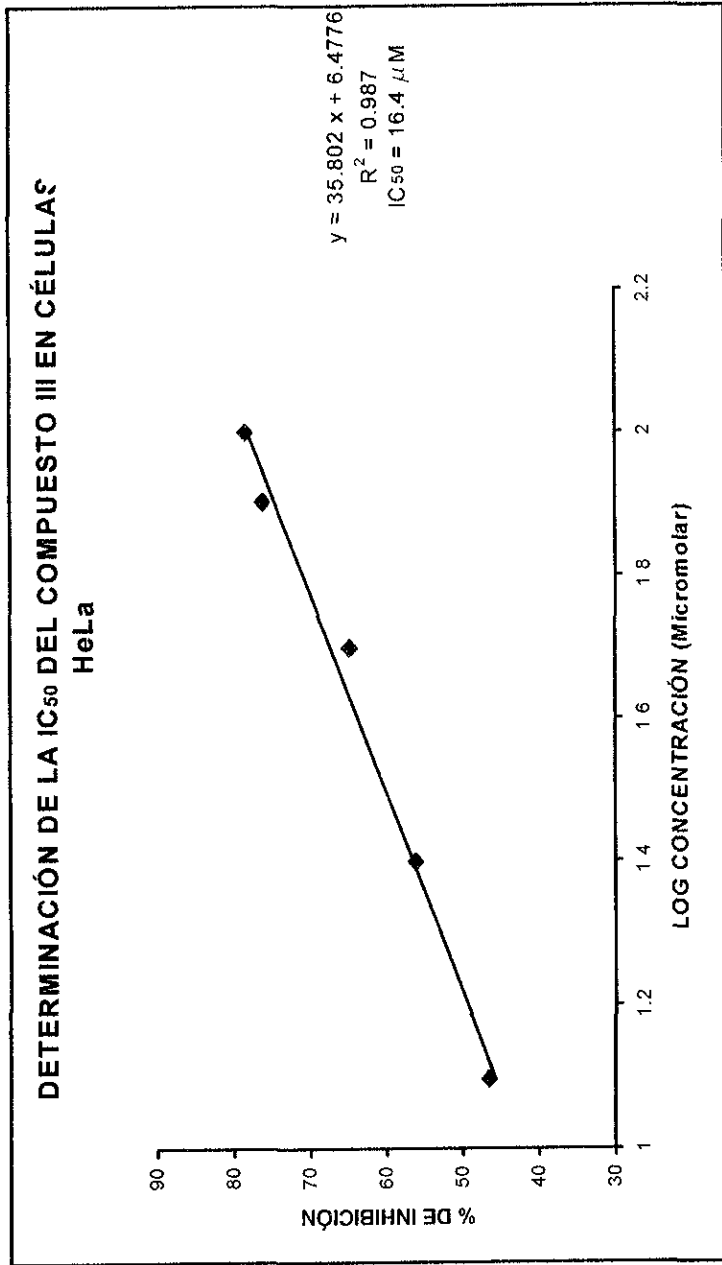


Fig. 14 Determinación del valor de IC₅₀ para el compuesto III (JLNZ-106), en la línea celular HeLa después de 72 h de tratamiento. El compuesto fue adicionado al cultivo celular a las 24 horas de crecimiento. Para preparar las soluciones a diferente concentración del compuesto se usó DMSO como disolvente

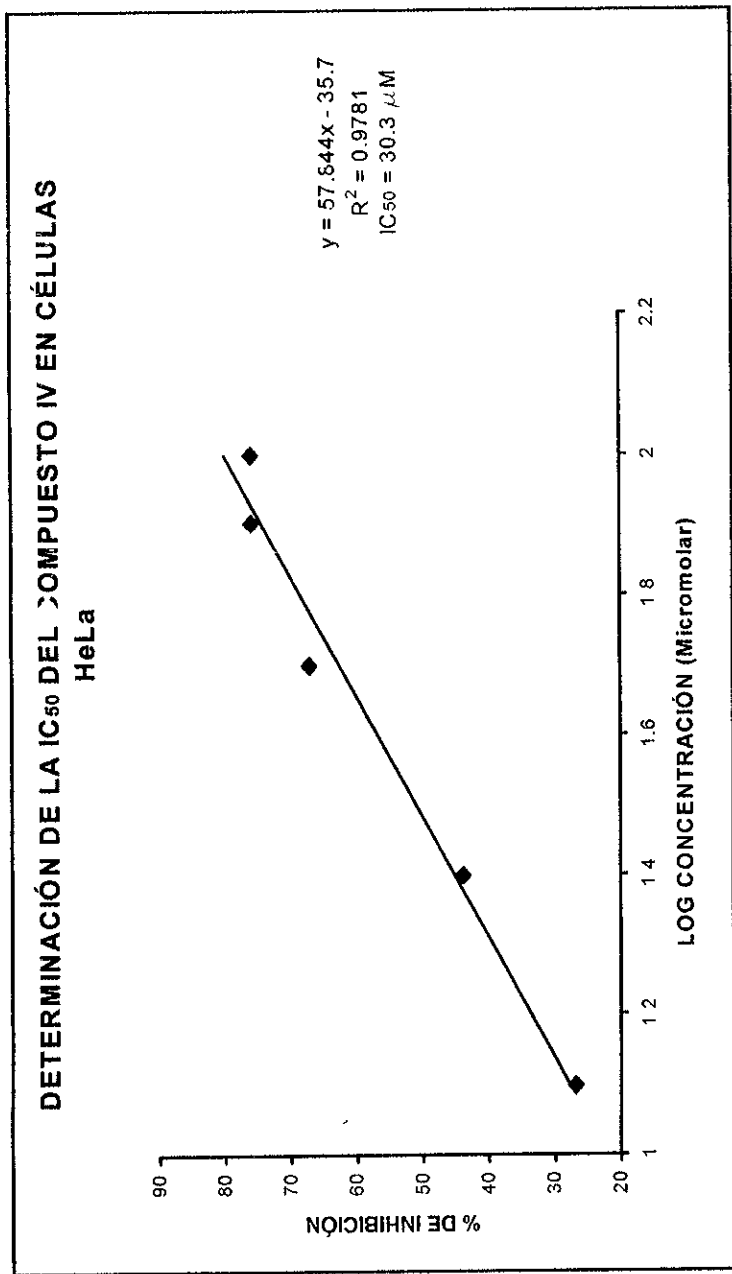


Fig. 15 Determinación de la IC₅₀ del compuesto IV (EDAG-IV-SMe), en las células HeLa después de 72 h de tratamiento con el compuesto. El compuesto se adicionó a las 24 h de crecimiento de la línea celular. Para preparar las soluciones a las diferentes concentraciones se usó DMSO como disolvente.

La actividad inhibitoria de los compuestos III y IV en la línea celular SW480, al igual que en las células HeLa, se ve aumentada con el aumento de la concentración, hasta 80 μM , mientras que a concentraciones mayores la actividad permanece prácticamente sin variación, como se muestra en la Fig. 16. En la misma figura se observa que los compuestos III y IV a concentraciones menores de 25 μM , muestran diferente actividad inhibitoria en las células SW480, tal como ocurre en las células HeLa, siendo mayor el efecto antiproliferativo del compuesto III, mientras que a concentraciones mayores y hasta 100 μM , la actividad antitumoral de ambos derivados de lactonas sesquiterpénicas son similares.

Los valores de IC_{50} para los compuestos III y IV son 73.5 μM y 80.4 μM respectivamente para esta línea celular. De los valores de IC_{50} obtenidos para los compuestos derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV, se puede observar que el compuesto III (Fig. 17) tiene un efecto inhibitorio del crecimiento ligeramente mayor que el compuesto IV (Fig. 18), en las células SW480.

Del conjunto de resultados obtenidos del ensayo para determinación de los valores de IC_{50} , se observa que de los derivados de lactonas sesquiterpénicas (compuestos III y IV), el compuesto III presenta mayor efecto antiproliferativo que el compuesto IV, en las líneas celulares HeLa y SW480.

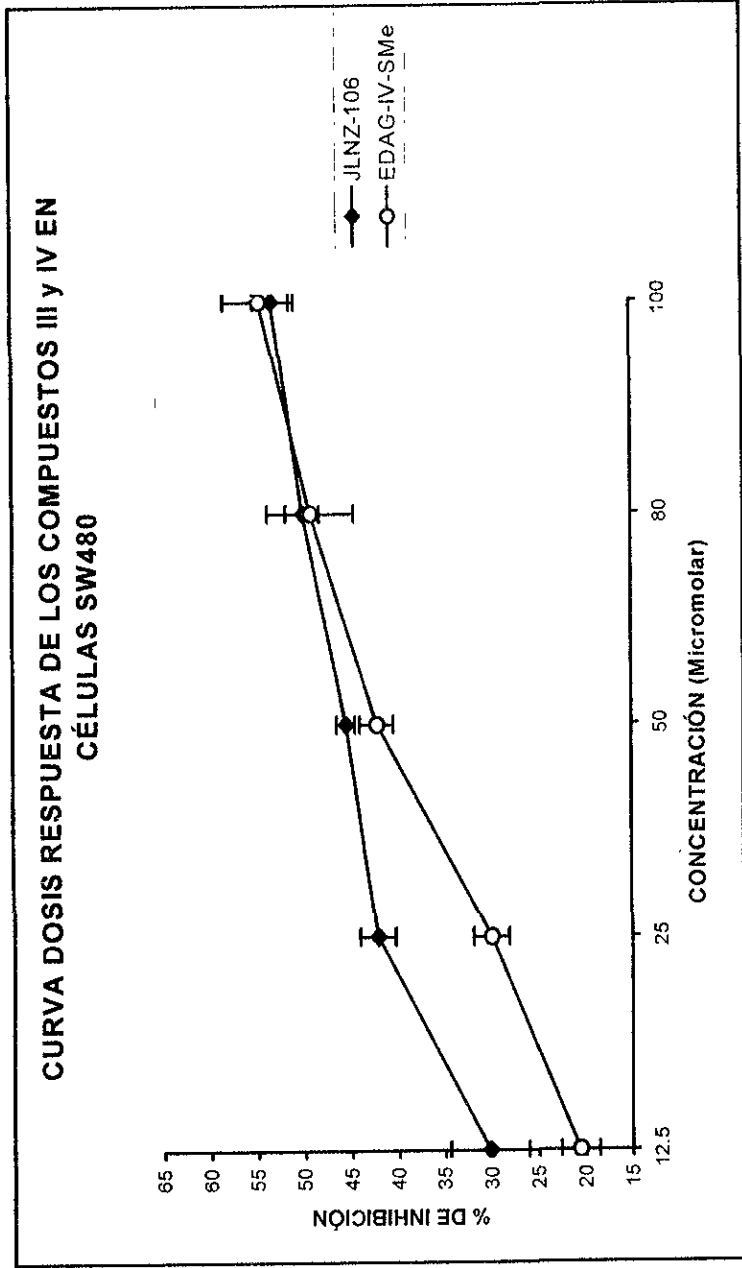


Fig. 16 Curva dosis respuesta de los compuestos III (JLNZ-106) y IV (EDAG-IV-SMe), probados a diferentes concentraciones micromolares en las células SW480, durante un período de 72 h. Los compuestos se adicionaron a las 24 h de crecimiento de la línea celular. Para preparar las diferentes concentraciones se usó DMSO como disolvente.

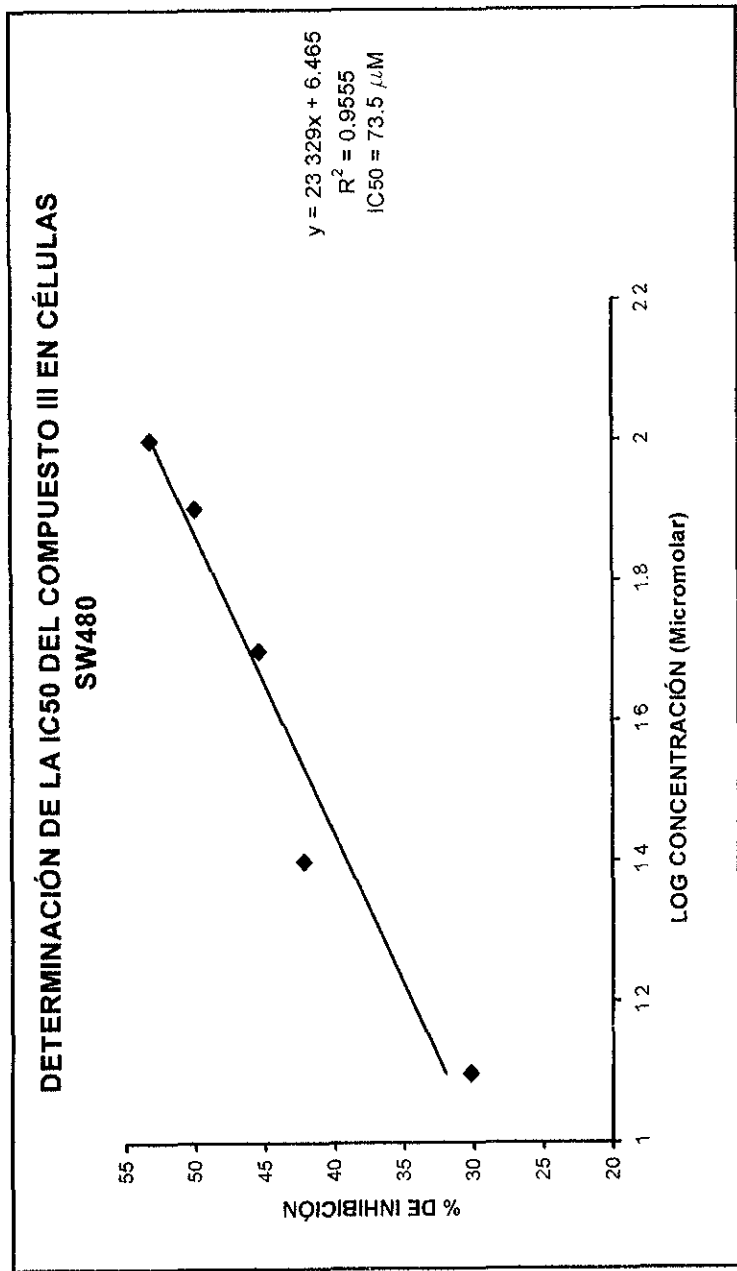


Fig. 17 Determinación del valor de IC₅₀ para el compuesto III (JUNZ-106), en la línea celular SW480 después de 72 h de tratamiento. El compuesto fue administrado al cultivo celular a las 24 h de crecimiento. Para preparar las soluciones a diferente concentración del compuesto, se usó DMSO como disolvente.

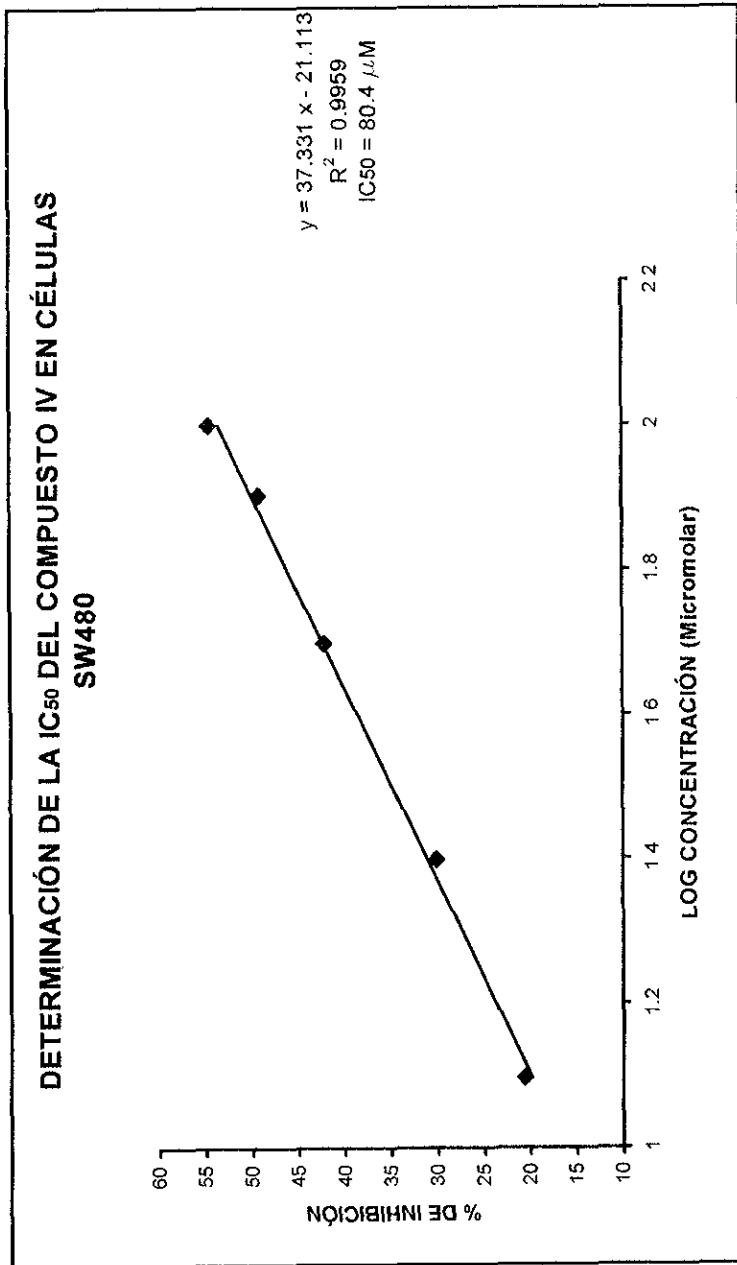


Fig. 18 Determinación del valor de IC₅₀ para el compuesto IV (EDAG-IV-SMe), en la línea celular SW480 después de 72 h de tratamiento. El compuesto fue adicionado al cultivo celular a las 24 h de crecimiento. Las soluciones del compuesto a diferente concentración se prepararon usando DMSO como disolvente.

7. DISCUSIÓN.

Los compuestos utilizados en la quimioterapia del cáncer presentan algunas desventajas, de entre las cuales destacan la inducción de la resistencia al tratamiento y los efectos adversos severos, por lo que la introducción de nuevos compuestos con actividad antitumoral sería de gran utilidad.

En el presente trabajo se evaluó la posible actividad antitumoral, de algunos derivados de lactonas sesquiterpénicas y compuestos heterocíclicos, en diferentes líneas celulares. De los derivados de lactonas sesquiterpénicas evaluados solo los compuestos III y IV, mostraron una actividad antitumoral *relevante en todas las líneas celulares tumorales* empleadas. Para los compuestos heterocíclicos probados, se observa que estos solo tienen una ligera actividad antitumoral a una concentración de 15 μM , en algunas de las líneas celulares usadas y que con el aumento de la concentración, la actividad inhibitoria aumenta *solo en algunos casos, sin embargo este efecto no fue generalizado.*

En cuanto al índice lactona/taxol calculado para los compuestos III y IV que presentaron actividad antitumoral, se observa que los derivados de lactonas sesquiterpénicas presentan una inhibición de crecimiento de 0.66-1.48 veces la presentada por el taxol, sin embargo es importante considerar que la concentración empleada de los compuestos lactónicos, es 60 veces mayor a la utilizada del taxol, lo cual indica que los compuestos III y IV son menos activos que el taxol para inhibir la proliferación celular.

Con relación a los valores de IC_{50} obtenido para los compuestos III y IV, en las líneas celulares HeLa y SW480, puede observarse que el derivado de lactonas sesquiterpénicas III, tiene mayor efecto antiproliferativo que el IV en ambas líneas celulares, y que la línea celular HeLa es más sensible a cada uno de los compuestos que las células SW480.

En la literatura se reportan los valores de IC_{50} para algunas lactonas sesquiterpénicas, probadas en líneas celulares de cáncer de colon (COLO 320), y células pequeñas de carcinoma de pulmón humano (GLC₄), en donde los valores de IC_{50} para compuestos con buena actividad antitumoral, son de 0.44-146 μ M a dos horas de exposición con estos compuestos, y a 96 horas de exposición los valores son de 0.17-15.4 μ M.⁽³²⁾ Beekman, et, al.,⁽³³⁾ además reportan los valores de IC_{50} para lactonas sesquiterpénicas, probadas a 48 horas en diversas líneas celulares tumorales tales como células de cáncer de colon, melanoma, leucemia, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de mama, etc., en donde el valor reportado tiene un intervalo de 0.013-22 μ M. En el caso de los derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV, los valores obtenidos de IC_{50} son de 16.4 μ M y 30.3 μ M en la línea celular HeLa, y de 73.5 μ M y 80.4 μ M en las células SW480, respectivamente a 72 horas de exposición. De acuerdo a lo expuesto anteriormente se puede decir que el compuesto III, presenta una actividad antitumoral mayor que el compuesto IV. Sin embargo de acuerdo a los valores de IC_{50} obtenidos y a los reportados, se observa que los compuestos evaluados en el presente trabajo, son menos potentes a los reportados en la literatura.

En el ensayo para determinar los valores de IC_{50} , se observa que la actividad antiproliferativa de los compuestos III y IV aumenta con el aumento de la concentración, pero solo a concentraciones menores de 80 μ M, ya que en el intervalo de 80-100 μ M la actividad de estos compuestos es prácticamente la misma, esto puede ser indicativo de que en este intervalo de concentraciones, los sitios enzimáticos alquilados por las lactonas sesquiterpénicas ya han sido saturados, o bien que se trate de un mecanismo de resistencia que presenten las células tumorales empleadas, cuando son incubadas con concentraciones elevadas de los compuestos. Sin embargo con los experimentos realizados en este trabajo, no puede conocerse cual es la razón de que en dicho intervalo de concentraciones, no se presente aumento de la actividad antiproliferativa.

De las lactonas sesquiterpénicas reportadas en la literatura, las más activas son aquellas que tienen un grupo metileno en la posición α a la lactona. La actividad antitumoral presentada por algunos de los compuestos derivados de lactonas sesquiterpénicas, y no por otros puede explicarse en base a las diferencias estructurales presentadas por estos compuestos. De los resultados obtenidos y en base a las estructuras presentadas por los compuestos III y IV, pueden observarse que estos dos compuestos son los únicos derivados de lactonas sesquiterpénicas, que presentaron actividad antitumoral considerable, y también los únicos que poseen un grupo acetilo en la posición 2, por lo cual este grupo quizá sea el único requerimiento estructural necesario en los compuestos evaluados, para que se presente la actividad antitumoral. La importancia del grupo acetilo en la molécula, puede ser debida a que este grupo le confiere mayor lipofilicidad a la molécula, lo cual le permite atravesar fácilmente las membranas celulares y llegar a los sitios blanco en donde debe ejercer su acción. Aquí cabe hacer notar la orientación del grupo acetilo, el cual esta hacia atrás del plano, en donde la estereoquímica presente en el carbono 2, dada por la orientación del grupo acetilo tal vez pudiera también estar involucrada en la actividad presentada por estos compuestos. Sin embargo para conocer si el grupo acetilo que esta en la posición 2 de la molécula y/o la estereoquímica presente en dicha posición, son esenciales para que se presente dicha actividad son necesarios estudios posteriores.

Sin embargo existen otras diferencias en las estructuras de los derivados de lactonas sesquiterpénicas evaluados, que pudieran influir para que se presente o no la actividad antitumoral. Dentro de estas diferencias pueden mencionarse las siguientes:

- De los siete derivados de lactonas sesquiterpénicas evaluados, los compuestos I y VII a diferencia del resto, no presentan el grupo carbonilo α,β -insaturado, el cual ha sido reportado por Beekman⁽³³⁾ como un requerimiento estructural necesario para que se presenta la actividad antitumoral, ya que a través de este grupo los compuestos pueden interactuar con algunos nucleófilos biológicos, tales como los grupos sulfhidrido libres de

residuos de cisteínas de algunas proteínas, interfiriendo así con la función de estas. Dichas proteínas están involucradas en procesos celulares claves, necesarios para la función celular, las cuales al ser bloqueadas bloquean la proliferación celular. Por lo que la falta del grupo carbonilo α,β -insaturado, puede impedir que dichos compuestos presenten actividad antitumoral.

- Por otro lado los compuestos I y VI presentan un anillo cicloheptano unido a la γ -lactona, el cual al ser un anillo de siete carbonos es menos estable que el ciclohexano presente en los compuestos III y IV, lo que tal vez impide que se manifieste la actividad antiproliferativa de estos compuestos, por problemas de estabilidad de la molécula.

- Adicionalmente los compuestos anteriormente mencionados (I, VI, VII) tiene como sustituyente un anillo pirimidina en el cual existe un grupo amino libre, que le confiere menor lipofiliidad a la molécula, y capacidad para formar puentes de hidrógeno, lo que disminuye su entrada a las células, en relación a los compuestos derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV. Beekman⁽³³⁾ y Jizaka⁽²⁷⁾ han encontrado en cuanto a la polaridad de los compuestos con actividad antitumoral, que a medida que aumenta la lipofiliidad de estos compuestos, también se aumenta su citotoxicidad.

- La falta de la actividad antitumoral por parte del compuesto II, puede ser explicada por que este carece de la presencia de la γ -lactona, que según lo reportado por Jisaka⁽²⁷⁾ es un grupo importante para que los compuestos desarrollen dicha actividad.

- En la Fig. 1 se puede observa que de los derivados de lactonas sesquiterpénicas que no presentan actividad antitumoral, el compuesto V es el que guarda mayor relación estructural con los compuestos activos III y IV. El hecho de que este compuesto no presente actividad inhibitoria del crecimiento, también puede ser debido tal vez a la polaridad de la molécula, en donde se ve que el derivado de lactonas sesquiterpénicas V, presenta un grupo alcohol en lugar del grupo acetilo de los compuestos III y IV en la posición 2 con la misma orientación que la del grupo acetilo, lo que le confiere menor lipofiliidad a la molécula, de

igual manera el alcohol presente en el anillo pirimidínico que esta como sustituyente en este compuesto, disminuye el carácter lipofílico del compuesto V con respecto a los compuestos III y IV.

- Finalmente los resultados de los dos derivados de lactonas sesquiterpénicas que presentan actividad antitumoral, muestran que el compuesto III es más potente antiproliferativo que el compuesto IV. Aunque estructuralmente los compuestos III y IV son muy parecidos, existen algunas diferencias estructurales que pueden ser las responsables, de las diferencias de actividades presentadas por estos compuestos, en donde el nitrógeno del anillo pirimidínico en el compuesto III, tiene unido un grupo isopropilo que le confiere mayor lipofilicidad a la molécula, en relación al hidrógeno que esta en el compuesto IV. Otra diferencia estructural entre ambas moléculas es que, entre los dos nitrógenos del anillo pirimidina en el derivado lactónico III está presente un grupo carbonilo, mientras que en el compuesto IV el oxígeno de este grupo es sustituido por un azufre (ligeramente menos polar que el oxígeno), lo cual no modifica considerablemente la polaridad de la molécula. Por último, otra diferencia entre las estructuras de ambos compuestos, es que en la posición α grupo carbonilo del anillo pirimidina, esta como sustituyente un grupo trifluorometilo en el compuesto III, el cual es cambiado a un grupo metilo en el compuesto IV, lo cual conduce a la pérdida de la lipofilicidad del compuesto III, sin embargo esta pérdida puede ser contrarrestada por la presencia del grupo isopropilo, dando como resultado una mayor lipofilicidad y por tanto mayor toxicidad del compuesto III en relación al IV.

Con todos los resultados obtenidos puede mencionarse que la presencia del grupo acetilo en la posición 2 de la estructura base de la lactona, parece ser un requerimiento estructural esencial para que se presente la actividad antitumoral, mientras que el grupo carbonilo α,β -insaturado y el grupo γ -lactona, son importantes pero no esenciales para que pueda llevarse a cabo dicha actividad.

Por su parte los compuestos heterocíclicos evaluados presentan un anillo pirimidínico, el cual se ha sido reportado por Gangjee⁽⁴⁵⁾, como un grupo importante para que los compuestos heterocíclicos presenten actividad antitumoral. Ninguno de estos compuestos presentó actividad antitumoral, debido quizá a que el anillo pirimidínico presente en cada uno de ellos, está fusionado con otro(s) anillos lo cual podría de alguna manera impedir que se llevara a cabo la actividad antitumoral, por bloquear estructuralmente al anillo pirimidínico y por tanto su función.

8. CONCLUSIONES.

Con los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo, pudo observarse que de los derivados de lactonas sesquiterpénicas probados, solo los compuestos III y IV presentaron una actividad inhibitoria, en todas las líneas celulares tumorales empleadas. Mientras que de los compuestos heterocíclicos evaluados ninguno presentó actividad antiproliferativa significativa.

La posible relación existente entre la estructura de los derivados de lactonas sesquiterpénicas, con la actividad antitumoral presentada por estos compuestos, muestra que el grupo acetilo en la posición 2, el grupo carbonilo α,β -insaturado y el grupo γ -lactona son requerimientos estructurales importantes para que se presente la actividad antitumoral, dentro de los cuales el grupo acetilo parece ser el que tiene mayor importancia.

En cuanto a los valores de IC_{50} obtenidos para los derivados de lactonas sesquiterpénicas III y IV y en base a los valores de IC_{50} reportados en la literatura para otras lactonas sesquiterpénicas,^(32 33) puede concluirse que ambos compuestos evaluados, son menos activos a los reportados en la literatura, en donde además el compuesto IV es menos activo que el III.

8. PERSPECTIVAS.

La identificación de nuevos compuestos con actividad antitumoral es de gran importancia, ya que pueden representar una alternativa más a los fármacos que ya se encuentran en el mercado con ciertos beneficios adicionales, y de esta forma ampliar el campo de la quimioterapia en una enfermedad tan ampliamente difundida como es el cáncer, además que el mercado actual de los agentes usados en el tratamiento de cáncer incluye compuestos que tienen un costo muy elevado por lo que nuevos fármacos podrían tener ventaja sobre los ya existentes.

De tal manera que de los compuestos probados, el III (JLN-106) y el IV (EDAG-IV-SMe), pueden representar una buena alternativa como compuestos con actividad antitumoral que pueden ser sometidos a investigaciones posteriores para tener un mejor seguimiento del mecanismo involucrado en su actividad, y aclarar si estos compuestos pudieran o no ser aplicados en la clínica como medicamentos para el tratamiento del cáncer

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

9. ABREVIATURAS.

Abs	Absorbancia
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
C	Concentración
° C	Grados centígrados
cAMP	Adenosina 5'- monofosfato cíclico
c.b.p.	Cuanto baste para
cels	Células
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D-MEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRPs	Proteínas relacionadas con la muerte celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fig	Figura
g	gramo
G ₀	Fase del ciclo celular en donde las células se encuentran es estado no proliferativo
G ₁	Fase del ciclo celular que representa el espacio entre la división celular y la síntesis de DNA
G ₂	Fase del ciclo celular que representa el espacio entre la síntesis del DNA y la división celular
h	Horas

Hepes	Ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etansulfónico
IC ₅₀	Concentración del compuesto que produce 50% de inhibición del crecimiento celular
in ²	pulgada cuadrada
IL	Interleucina
L	Litro
lb	Libra
Log	Logaritmo base diez
μ	Micra
μL	Microlitro
μM	Micromolar
M	Fase mitótica del ciclo celular
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kappa B
nM	Nanomolar
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PDE	Fosfodiesterasa
pH	Potencial de hidrogeno
R ²	Coefficiente de correlación al cuadrado de una línea recta
r.p.m.	Revoluciones por minuto

RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nerviosos Central
T	Células del Sistema Inmune
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TS	Timidilato sintasa
% v/v	Porcentaje de volumen en volumen
V	Volumen

10. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Woodruffm, M. "Cellular variation and adaptation in cancer. Biological basis and therapeutic consequences". Cap. 1, Oxford University Press, E. U. A. pp 1-11, 54-69, 71-76, (1990).
- 2.- Nyce, J. W. Drug-induce DNA hypermethylation: A potential mediator of acquired drug resistance during cancer chemotherapy. *Mutation Res.* 386. 153-161, (1997).
- 3.- Tierney, M. L., McPhee, J. S , Papadakis, A. M. "Diagnóstico clínico y tratamiento". *El Manual Moderno, México, 30ª Edición,* pp 69-72, (1995).
- 4.- Cottu, P. H., Muzeau, F., Estricher, A., Fléjou, J. F., Iggo, R., Thomas, G., Hamelin, R. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 13: 2727-2730, (1996).
- 5.- González, V. C. "Detección del virus del papiloma humano en líneas celulares y evaluación de la actividad antitumoral de nuevas moléculas". Tesis Profesional, Facultad de Química, U.N.A.M. (1997).
- 6a.- Goodman, G. A., Rall, W. T., Nies, J. A., Taylor, P. "Las bases farmacológicas de la terapéutica" Parte XII: Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas, Panamericana, México, 8ª Edición, pp 1163-1169, (1991).
- 6b.- Goodman, G. A., Rall, W. T., Nies, J. A., Taylor, P. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". Cap. 52: Agentes antineoplásicos, Panamericana, México, 8ª Edición, pp 1171-1222, (1991).
- 7.- Mihich, E. "Drug Resistance: Mechanism and reversal". John Libbey CIC, Pezcoller Foundation Symposia, Trento Itali, pp 89-100, (1989).

- 8.- Riggs, E. C., Bennett, P. J. "Comprehensive Textbook of Oncology: Section D Chemotherapy". Cap. 55: Principles of Cancer Chemotherapy, Williams and Wilkins, pp 327-336, (1997).
- 9.- Tang, G. D., Li, L., Chopra, D. P., Porter, A. T. Extended Survivability of Prostate Cancer Cells in the Absence of Trophic Factors: Increase Proliferation, Evasion of Apoptosis, and Role of Apoptosis Proteins. *Cancer Res.* 58: 3466-3479, (1998).
- 10.- McCloskey, D. E., Kaufmann, S. H., Prestigiacomo, L. J., Davidson, N. E. Paclitaxel Induces Programmed Cell Death In MDA-MB-468 Human Breast Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 2: 847-854, (1996).
- 11.- Pezzuto, J. Taxol production in plant cell culture comes of age. *Nature Biotech.* 14: 1083, (1996).
- 12.- Scatena, C. D., Stewart, Z. A., Mays, D., Tang, L. J., Keefer, C. J., Leach, S. D., Pietenpol, J. A. Mitotic Phosphorylation of Bcl-2 during Normal Cell Cycle Progression and Taxol-induced Growth Arrest. *J. Biol. Chem.* 273: 30777-30784, (1998).
- 13.- Lee, L. F., Li, G., Templeton, D. J., Ting, J. P. Paclitaxel (Taxol)-induced Gene Expression and cell Death Are Both Mediated by the Activation of c-Jun NH₂-terminal Kinase (JNK/SAPK). *J. Biol. Chem.* 273: 28253-28260, (1998).
- 14.- Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E., D'Amato, R. J. Inhibition of Angiogenesis and Breast Cancer in Mice by the Microtubule Inhibitors 2-Metoxystriadiol and Taxol. *Cancer Res.* 57: 81-86, (1997).
- 15.- Torres, K., Band, S. H. Mechanisms of Taxol-induced Cell Death Are Concentration Dependent. *Cancer Res.* 58: 3620-3626, (1998).
- 16.- Sumantran, V. N., Ealovega, M. W., Nuñez, G., Clarke, M. F., Wicha, M. S. Overexpression of Bcl-x_s Sensitizes MCF-7 Cells to Chemotherapy-induced Apoptosis. *Cancer Res.* 55: 2507-2510, (1995).

- 17.-** Haldar, S., Chintapalli, J., Core, C. M. Taxol Induces bcl-2 phosphorylation and Death of Prostate Cancer Cells. *Cancer Res.* 56: 1253-1255, (1996).
- 18.-** Strobel, T., Kraeft, S. K., Chen, L. B., Cannistra, S. A. Bax Expression Is Associated with Enhanced Intracellular Accumulation of Paclitaxel: A Novel Role for Bax during Chemotherapy-Induced Cell Death. *Cancer Res.* 56: 4776-4781, (1998).
- 19a.-** McMurry, J. "Química Orgánica" Cap. 21: Derivados de Ácidos carboxílicos y Reacciones de Sustitución Nucleofílica en el Acilo, Grupo Editorial Iberoamérica, 3^{RA} Edición, E. U. A. pp 789-791 (1992).
- 19b.-** McMurry, J. "Química Orgánica" Cap. 23: Reacciones de Condensación de Grupos Carbonilo, Grupo Editorial Iberoamérica, 3^{RA} Edición, E. U. A. pp 874-875 (1992).
- 19c.-** McMurry, J. "Química Orgánica" Cap. 28: Lípidos, Grupo Editorial Iberoamérica, 3^{RA} Edición, E. U. A. pp 1065-1071 (1992).
- 20.-** Lyss, G., Schmidt, T. J., Merfort, I., Pahl, H. L. Helenalin, an Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactone from Arnica, Selectively Inhibits Transcription Factor NF- κ B. *Biol. Chem.* 378: 951-961, (1997).
- 21.-** Blanco, J. G., Gil, R. R., Alvarez, C. I., Patrino, L. C., Raimondi, S. G., Flury, A. A novel activity for a group of sesquiterpene lactones: inhibition of aromatase. *FEBS Letters.* 409: 396-400, (1997).
- 22.-** Gören, N., Woerdenbag, H. J., Johansson C. B. Cytotoxic and Antibacterial Activities of Sesquiterpene Lactones Isolated from *Tanacetum praeteritum* subs. *praeteritum*. *Planta Med.* 62: 419-422 (1996).
- 23.-** Beekman, A. C., Woerdenbag, H. J., Uden, W. V., Pras, N., Konings, A. W., Wikström, H. V., Schmidt, T. J. Structure-Cytotoxicity Relationships of Some Helenanolide-Type Sesquiterpene Lactones. *J. Nat. Prod.* 60: 252-257, (1997).

- 24.-** Robles, M., Aregullin, M., West, J., Rodríguez, E. Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Planta Med.* 61: 199-203, (1995).
- 25.-** Cho, J. Y., Park, J., Too, E. S., Baik, K. U., Jung, J. H., Lee, J., Park, M. H. Inhibitory Effect of Sesquiterpene Lactones from *Saussurea lappa* on Tumor Necrosis Factor- α Production in Murine Macrophage Like Cells. *Planta Med* 64: 594-597, (1998).
- 26.-** Topcu, T., Cordell, G. A., Farnsworth, N. R., Fong, H. S. Studies on Zoapatle VII: Novel Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Montana Tomentosa* ssp. *microcephala*. *J. Pharm. Sci.* 77: 553-556, (1996)
- 27.-** Jísaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Huffman, M. A., Koshimizu, K. Antitumoral and Antimicrobial Activities of Bitter Sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a Possible Medicinal Plant Used by Wild Chimpanzees. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 833-834, (1993).
- 28.-** Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Bautista, B. H., Anaya, A. L., Hennsen, B. L., Mata, R Biochemically Active Sesquiterpene Lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* 40: 419-425, (1995).
- 29.-** Díaz, E., Barrios, H., Nava, J. L., Enriquez, R. G., Guzmán, A , León, G. L., Fuentes, J. F., Fuentes, B. A., Quintero, A., Solano, J. D. Stereoselective Michael addition of 6-Amino-1,3-dimethyl-2,4-pyrimidinedione to the Exocyclic Methylene of Three Sesquiterpene Lactones. ^1H and ^{13}C NMR Evidence of a New C-C Bond and Lactam Formation. *J. Heterocyclic Chem.* 34: 1037-1041, (1997).
- 30.-** Park, E. J., Kim, J. Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from *Inula britannica*. *Planta Med.* 64: 752-754, (1998).
- 31.-** Ginot, L. L., Demarquay, D., Kiss, R., Kasprzyk, P. G., Dassonneville, L. Homocamptothecin, an E-Ring Modified Camptothecin with Enhanced Lactone Stability, Retains Topoisomerase I-target Activity and Antitumor Properties. *Cancer Res.* 59: 2939-2943, (1999).

- 32.-** Woerdenbag, H. J., Merfort, I., Paßreiter, C. M., Schmidt, T. J., Willuhn, G., Uden, W. V., Pras, N., Kampinga, H. H., Konings, A. W. Cytotoxicity of Flavonoids and Sesquiterpene Lactones from Arnica Species Against the GLC₄ and the Colo 320 Cell Line. *Planta Med.* 60: 434-437, (1994).
- 33.-** Beekman, A. C., Wierenga, P. K., Woerdenbag, H. J., Uden W. V., Pras, N., Konings, A. W., Feraly, F. S., Galal, A. M., Wikström, H. V. Artemisinin-Derived Sesquiterpene Lactones as Potential Antitumour compounds: Cytotoxic Action against Bone Marrow and Tumour Cells. *Planta Med.* 64: 615-619, (1998).
- 34.-** Giordano, O. S., Guerrero, E., Pestchanker, M. J. The Gastric Cytoprotective Effect of Several Sesquiterpene Lactones. *J. Nat. Prod.* 53: 803-809, (1990).
- 35.-** Francois, G., Passreiter, C. M., Woerdenbag, H. J., Looveren, M. V. Antiplasmodial Activities and Cytotoxic Effects of Aqueous Extracts and Sesquiterpene Lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Med.* 62: 126-129, (1996).
- 36.-** Beg, A. A., Baltimore, D. An Essential role for NF- κ B in Preventing TNF- α -Induced Cell Death. *Science* 274: 782-784, (1996).
- 37.-** Wang, C. Y., Mayo, M. W., Baldwin, A. S. TNF- α and Cancer Therapy-Induced Apoptosis: Potentiation by Inhibition of NF- κ B. *Science.* 274: 784-787, (1996).
- 38.-** Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Grenn, D. R., Verma, I. M. Suppression of TNF- α -Induced Apoptosis by NF- κ B. *Science* 274: 787-789, (1996).
- 39.-** Rüngeler, P., Lyß, G., Castro, V., Mora, G., Pahl, H., Merfort, I. Study of three Sesquiterpene Lactones from *Tithonia diversifolia* on their Anti-inflammatory Activity Using the Transcription factor NF- κ B and Enzymes of the Arachidonic acid Pathway as targets. *Planta Med.* 64: 588-593, (1998).
- 40.-** Hall, I. H., Starnes, C. O., Lee, K. H., Waddell, T. G. Mode of Action of Sesquiterpene Lactones as Anti-inflammatory Agents. *J. Pharm. Sci.* 69: 537-543, (1980).

- 41.- Jianmei, H., Jialin, W., Chunshu, Y. Sesquiterpene Lactones from the Pericarp of *Illicium Dunnianum*. *Phytochemistry* 46: 777-780, (1997).
- 42.- Schaffner, W. Granny's Remedy Explained at the Molecular Level: Helenalin Inhibits NF- κ B. *Biol. Chem.* 378: 935, (1997).
- 43.- Chen, C. H., Yang, L. M., Lee, T. T., Shen, Y. C., Zhang, D. C., Pan, D. J., McPhail, D. R., Liu, S. Y., Li, D. H., Cheng, Y. C., Lee, K. H. *Antitumor Agents-CL1. Bis(helenaliny)l* Glutarate and Bis(Isoalantodiol-B)Glutarate, Potent Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II. *Bioorg. Med. Chem.* 2: 137-145, (1994).
- 44.- Ding, Y., Zhang, Y. Y., Zhang, J., Chen, Y. Q. Syntheses and anticancer activity of ribonucleoside analogues containing thio-substituted five-membered heterocyclic base. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 1607-1610, (1997)
- 45.- Ganjee, A., Devraj, R., McGuire, J. J., Kisliuk, R. L., Effect of Bridge Region Variation on Antitumor Activity of Classical 5-Substituted 2,4-Diaminofuro[2,3-d]pyrimidines. *J. Med. Chem.* 38: 3798-3805, (1995).
- 46.- Hamann, L. G., Higuchi, R. I., Zhi, L., Edwards, J. P., Wang, X. N., Marschke, K. B., Kong, J. W., Farmer, L. J., Jones, T. K. Synthesis and Biological Activity of a Novel Series of Nonsteroidal, Peripherally Selective Androgen Receptor Antagonist Derived from 1,2-Dihydropyridono[5,6-g]quinolines. *J. Med. Chem.* 41:623-639, (1998).
- 47.- Merz, K. H., Marko, D., Regiert, T., Reiss, G., Frank, W., Einsenbrand, G. Synthesis of 7-Benzylamino-6-chloro-2-piperazino-4-pyrrolidinopteridine and Novel Derivatives Free of Positional. Potent Inhibitors of cAMP-Specific Phosphodiesterase and of Malignant Tumor Cell Growth. *J. Med. Chem.* 41: 4733-4743, (1998).
- 48.- Díaz, P., Michel, S., Stella, L., Charpentier, B. Synthesis and Biological Activities of New Heterocyclic aromatic retinoids. *Bioorg. Med Chem.* 7: 2289-2294, (1997).

- 49.-** Ohsumi, K., Hatanaka, T., Fujita, K., Nakagawa, R., Fukuda, Y., Nihei, Y., Suga, Y., Morinaga, Y., Tsuji, A., Tsuji, T. Synthesis and Antitumor Activity of Cis-restricted Combrestastatins. 5-Membered Heterocyclic Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Letters* 8:3153-3158, (1998).
- 50.-** Kawakami, M., Koya, K., Ukai, T., Tatsuta, N., Ikegawa, A., Ogawa, K., Shishido, T., Chen, L. B. Structure-Activity of Novel Rhodacyanine Dyes as Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* 41: 130-142, (1998).
- 51.-** Shi, D. F., Bradshaw, T. D., Wrigley, S., McCall, C. J., Lelieveld, P. Antitumor Benzothiazoles. 3¹ Synthesis of 2-(4-Aminophenyl)benzothiazoles and Evaluation of Their Activities against Breast Cancer Lines in Vitro *J. Med. Chem.* 39: 3375-3384, (1996).
- 52.-** Mishra, L., Said, M. K., Itokawa, H., Takeya, K. Antitumor and Actimicrobial Activities of Fe(II)/Fe(III) Complexes Derived from some Heterocyclic Compounds. *Bioorg. Med. Chem.* 9:1241-1245, (1995).
- 53.-** Solano, A. P. "Detección de mutaciones del gen p53 en tumores de pacientes mexicanos en cáncer de recto" Tesis Profesional, Facultad de Química, U.N.A.M. (1997).
- 54.-** Saphir Ann., Angiogenesis: The Unifying Concept In Cancer?. *J. Nat. Cancer Inst.* 89: 1658-1659, (1997).
- 55.-** Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harman, B. V. Apoptosis. Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer* 73. 2013-2023, (1994).
- 56.-** Lu, Q. L., Hanby, A. M., Nasser, A. M., Hajibagheri, N. M., Gschemeissner, S. E., Lu, P. J., Papadimitriou, J. T., Krajewski, S., Redd, J. C., Wright, N. A. Bcl-2 protein localizes to the chromosomes of mitotic nuclei and is correlated with the cell cycle in culture epithelial cell lines. *J. Cell Sci.* 107: 363-371, (1994).
- 57.-** Sakuragi, N., Ohkouchi, T., Hareyama, H., Ikega, I. K., Watari, H., Fujimoto, T., Kumabara, M., Yamamoto, R., Sagawa, T., Fujino, T., Fujimoto, S. Bcl-2 Expression and Prognosis of Patients with Endometrial Carcinoma. *Int. J. Cancer* 79: 153-158, (1998).

- 58.-** Saikumar, P., Dong, Z., Patel, Y., Hall, K., Hopfer, U., Weinberg, J. M., Venkatachalam, M. A. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 17: 3401-3415, (1998)
- 59.-** Brunstugun, O. T., Døskeland, S. O. Injected cytochrome c induces apoptosis. *Nature* 391: 449-450, (1998)
- 60.-** Ortiz, A., Ziyadeht, F. N., Neilson, E. G. Expression of Apoptosis-regulatory Genes in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells Exposed to High Ambient Glucose and in Diabetic Kidney. *J. Inv. Med.* 45: 50-56, (1997).
- 61.-** Boise, L. H., González G. M., Postema, C. E., Ding, L., Lidsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nuñez, G., Thompson, C. B. bcl-x, a bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell* 74: 597-608, (1993).
- 62.-** Lieberman, D. A., Hoffman, B., Steinman, R. A. Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways *Oncogene* 11: 199-210, (1995)
- 63.-** Das, R., Premkumar, R., Chatterjee, D., Andrews, D. W. Identification of a novel Bcl-2 related gene BRAG-1, in human glioma. *Oncogene* 12: 947-951, (1996).
- 64.-** Farrow, S. N., Brown, R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 45-49, (1996).
- 65.-** Kelckar, A., Thompson, C. B. Bcl-2-family proteins: the role BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 8: 324-330, (1998).
- 66.-** Bargou, R. C., Daniel, P. T., Mapara, M. Y., Bommert, K., Wagener, C., Kallinich, B., Royer, H. D., Dörken, B. Expression of the bcl-2 Gene Family in Normal and Malignant Breast Tissue: Low bax- α Expression in Tumor Cells Correlates with Resistance Towards Apoptosis. *Int. J. Cancer* 60: 854-859, (1995).
- 67.-** Wyllie, A. An endonuclease as last. *Nature* 391: 20-21, (1998).
- 68.-** Yang, E., Korsmeyer, J. S. Molecular Thanatopsis: A Discourse on the BCL-2 Family and Cell Death. *Blood* 88: 386-401, (1996).

- 69.-** Gazzaniga, P., Gradihone, A., Vercillo, R., Gandini, O., Sívestri, I., Napolitano, M., Albonici, L., Vincenzoni, A., Gallucci, M., Frati, L., Aglianó, A. M. *bcl-2/bax mRNA Expression Ratio as Prognostic Factor in Low-Grade Urinary Bladder Cancer.* *Int. J. Cancer* 69: 100-104, (1996)
- 70.-** Sie. a, A., Castellsagué, X., Coll, T., Mañas, S., Escobedo, A., Moreno, A., Fabra, A. *Expression of Death-Related Genes and their Relationship to Loss of Apoptosis in T, Ductal Breast Carcinomas.* *Int. J. Cancer* 79. 103-110, (1998).
- 71.-** Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittender, T., Lutz, R. J., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. *Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 14681-14686, (1998).
- 72.-** Merchant, A. K., Loney, L. T., Maybaum, J. *Expression of wild-type p53 stimulates an increase in both Bax and Bcl-x_L protein content in HT29 cells.* *Oncogene* 13: 2631-2637, (1996).
- 73.-** Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C., Korsmeyer, S. J. *Enforced dimerization of Bax result in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis* *EMBO J.* 17: 3878-3885, (1998).
- 74.-** Fisher, T. C., Milner, A. E., Gregory, D. C., Jackman, A. L., Aherne, W. G., Hartley, J. A., Dive, C., Hickman, J. A. *bcl-2 Modulation of Apoptosis Induced by Anticancer Drugs: Resistance to Thymidylate Stress Is independent of Classical Resistance Pathways.* *Cancer Res.* 53: 3321-3326, (1993).
- 75.-** Monney, L., Otter, I., Olivier, R., Ozer, L. H., Haas, A. L., Omura, S., Borner, C. *Defects in the Ubiquitin Pathway Induce Caspase-independent apoptosis Blocked by Bcl-2.* *J. Biol. Chem.* 273: 6121-6131, (1998)

- 76.-** Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, (1998).
- 77.-** Orth, K., O'Rourke, K., Salvesen, G. S., Dixint, V. M. Molecular Ordering of Apoptotic Mammalian CED-3/ICE-like proteases. *J. Biol. Chem.* 271: 20977-20980, (1996).
- 78.-** Correa, L., Quintero, A., García, A. C., Cerbón, M. A Caracterización molecular de líneas celulares de cervix humano: Regulación de la expresión de p53 y Bcl-2 por estrogénos. Congreso Nacional. Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. Guanajuato, México. Octubre (1998)
- 79.-** "American Type Culture Collection, Catalogue of Cell Lines & Hybridomas" Editores: Hay, R., Caputo, J., Chen, T. P., Macy, M., McClintock, P., Reid, Y., E. U. A., 7ª Edición, pp 4, 122, 129, (1992).
- 80.-** Rivera, L. "Detección de la actividad de fármacos tipo heparan sulfato en líneas celulares tumorales". Tesis Profesional, Facultad de Química, U.N.A.M. (1995).
- 81.-** Darlig, D. C., Morgan, S. J., "Animal Cells Culture and Media ". Wiley, E. U. A., pp 68, 69, 92, 93, 111, (1994).
- 82.-** Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Citotoxicity Assay. *J. Immunol. Meths.* 65: 55-63, (1983).
- 83.-** Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Aboot, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., Boyd, M. R. Feasibility of drugs Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.* 48: 589-601, (1988).
- 84.-** Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Jhonson, B. E., Glastein, E., Minna, J. D. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer* 57: 540-547, (1985).

- 85.-** Carrichael, J , DeGraff, W G., Gazdar, A. F , Minna, J. D., Mitchell, J. B. Evaluation of the tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay. Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res.* 47. 936-942, (1987).
- 86.-** The Merck Index. U.S A., 11^{ra} Edición, pp 1435, (1989).
- 87.-** Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S , Croce, C. M. Down-Regulation of bcl-2 by p53 in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 54: 2095-2097, (1994)
- 88.-** Otter, I., Conus, S., Ravn, U., Rager, M , Olivier, R., Monney, L., Fabbro, D., Borner, C. The Binding Properties and Biological Activities of Bcl-2 and Bax in Cells Exposed to Apoptotic Stimuli. *J. Biol. Chem.* 273: 6110-6120, (1998).