

140



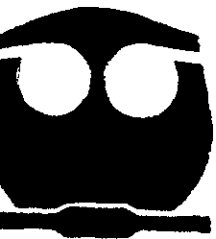
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INHIBICION DE LA SINTESIS DE ACIDOS NUCLEICOS POR UN COMPUESTO DERIVADO DE QUINOLINAS.

298912  
216867

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A  
**ANSELMO SOLIS LOPEZ**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

2001



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. Marisol López López  
Secretario: Prof. Homero Hernández Montes  
Primer Suplente: Prof. Ma. Del Carmen Parra González  
Segundo Suplente: Prof. María De Lourdes Mayet Cruz.

**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:**



Anselmo Solís López

## **Agradecimientos:**

### **A Dios:**

*Por el amor, la vida y esta nueva oportunidad que me ha brindado*

### **A mis Padres: Paulino y Luisa**

*Por darme la vida, por su amor y comprensión, por el cuidado y la enseñanza, por su apoyo en los momentos difíciles y por su alegría en la bienaventuranza.*

### **A mis hermanos: María, Timo, Leonel, Lino, Martín y Julia.**

*Por su apoyo y comprensión, por sus consejos, por no dejarme solo en los momentos difíciles y por compartir conmigo su tiempo, su alegría y su amistad.*

### **A toda mi familia:**

*Por su cariño, por el aprecio y por todas las bondades compartidas.*

### **A todos mis amigos:**

*Por acompañarme en mis ratos de tristeza, de esperanza, de sueños y felicidad.*

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la facultad de Química:**

*Por la formación, la enseñanza y los valores que me ha dado.*

### **A mis profesores:**

*Por dedicar su tiempo en mi enseñanza y en especial, gracias a aquellos que se han preocupado por mi bienestar más allá de las aulas.*

### **Al profesor Q.F.B. Raúl Garza Velasco:**

*Por su apoyo en todo momento, por su comprensión y su amistad.*

**A José D. Solano, Miguel Martínez, Miguel Vilchis, Raquel, Ziohumara y Elizabeth:**

Por su amistad, sus consejos, por su apoyo y comprensión

**A todos mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular:**

Por compartir su tiempo, su amistad y sus consejos.

**Al Dr. Alfonso Lira Rocha:**

Por su amable e imprescindible contribución al facilitarnos el compuesto R-8, base y origen de este trabajo.

**A la Dra. Angelina Quintero Ruiz:**

Por su entrega y dedicación a la investigación y la enseñanza y por colaborar en pro del bienestar de aquellos que hemos tenido la oportunidad de estar bajo su asesoría y apoyo.

**A los integrantes del jurado:**

Prof. Angelina Quintero Ruiz.

Prof. Marisol López López.

Prof. Homero Hernández Montes.

Prof. Ma. Del Carmen Parra González.

Prof. María De Lourdes Mayet Cruz.

Por sus consejos, comentarios y sugerencias en la realización del presente trabajo.

## ÍNDICE

1. Resumen .....	1
2. Objetivos .....	2
3. Introducción.....	3
4. Metodología experimental.....	16
5. Resultados.....	29
6. Discusión.....	33
7. Conclusiones.....	36
8. Perspectivas.....	37
9. Abreviaturas.....	38
10. Bibliografía.....	40

## 1. Resumen.

Cualquiera que sea la causa, el cáncer es básicamente una enfermedad que se produce en diferentes tejidos y que se caracteriza por un cambio en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación celular <sup>(1)</sup>

La investigación en el desarrollo de nuevos fármacos permite proponer medicamentos más eficientes para la cura del cáncer, ya que muchos de los compuestos disponibles no cumplen la meta.<sup>(1)</sup>

Alvarez –Ibarra C. y col. (1997) reportaron la síntesis de un grupo de tiazolo[5,4-b] quinolinas desconocidas y el estudio de sus efectos *in vitro* como potenciales agentes antitumorales <sup>(2, 3)</sup> Las características estructurales y electrónicas de dichas moléculas fueron clave para que, posteriormente, fueran sintetizados compuestos “híbridos” de las 9-anilinoacridinas (agentes antitumorales de efectividad conocida) y de las tiazolo[5,4-b]quinolinas los cuales fueron postulados como potenciales intercaladores del DNA.<sup>(3)</sup>

Estudios preliminares<sup>(4)</sup> demostraron que uno de estos compuestos, el R-8, la 9-anilino-2-(N,N-dietiletilendiamino)tiazolo[5,4-b]quinolina, inhibía la proliferación celular *in vitro* en diferentes líneas celulares tumorales: de colon SW-480, SW620, de mama: MCF-7, de ovario CHO y de cérvix. Calo, C-33 y HeLa En el presente trabajo se demostró que el compuesto R-8 inhibe *in vitro* la incorporación de timidina-<sup>14</sup>C al DNA en las líneas celulares antes mencionadas, y presumiblemente produce apoptosis, previo arresto del ciclo celular en fase G2-M, demostrado por citometría de flujo en la línea celular HeLa

## 2. Objetivos.

### **Objetivo general:**

- Comparar el efecto inhibitorio *in vitro* de la 9-anilino-2-(N,N-dietilendiamino)triazolo[5,4-b]quinolina (compuesto R-8) sobre la síntesis de DNA en siete líneas celulares de diferente origen.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar la cinética de inhibición *in vitro* del compuesto R-8 sobre la proliferación celular de HeLa.
- Determinar la inhibición por R-8 de la incorporación de timidina  $-^{14}\text{C}$  a la síntesis de DNA en siete líneas celulares.



### **3. Introducción.**

#### **3.1 Cáncer.**

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 que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.<sup>(5)</sup>

Inmediatamente después de la fertilización, las células embrionarias se dividen rápidamente iniciando un programa multifacético de diferenciación celular. Entre los primeros cambios se produce una rigurosa regulación sobre la proliferación celular. En organismos adultos, muchas células no proliferan. Algunas son terminantemente diferenciadas y no pueden dividirse, mientras que otras se dividen únicamente cuando se origina el reemplazamiento de células maduras o células dañadas. Algunas células que fallan para la regulación de la proliferación pueden dar surgimiento a un tumor<sup>(6)</sup>

La mayoría de los tejidos normales están diferenciados; esto es, han desarrollado una apariencia y función especializada.<sup>(7)</sup> Las células que han sufrido una transformación neoplásica proliferan en forma excesiva y forman tumores locales que pueden comprimir o invadir las estructuras normales adyacentes. Una pequeña subpoblación de células dentro del tumor puede describirse como células del tallo tumoral. Estas células mantienen la capacidad de experimentar ciclos repetidos de proliferación así como de migrar a sitios distantes en el cuerpo para colonizar varios órganos, en el proceso denominado metástasis. Las células del tallo tumoral pueden expresar entonces capacidad clonogénica o formadora de colonias.<sup>(1)</sup>

Una célula tumoral es distinguida de una célula normal por propiedades como son su inmortalidad, transformación morfológica y algunas veces, por su habilidad para realizar metástasis.<sup>(8)</sup>

## **3.2 Carcinogénesis.**

Los oncogenes son identificados por cambios genéticos que representan funciones adquiridas asociadas con las propiedades de una célula tumoral (inmortalidad, transformación morfológica y habilidad para realizar metástasis) Un oncogen puede ser derivado de un proto-oncogen por mutaciones que afectan su función o nivel de expresión <sup>(8)</sup>

El DNA de virus tumoral lleva oncogenes sin complementos celulares. Sus oncogenes pueden trabajar inhibiendo la actividad de supresores tumorales celulares, los cuales son identificados por la pérdida de la mutación funcional que permite el incremento de la proliferación celular. El RNA de virus tumoral lleva v-onco genes que son derivados de la transcripción de mRNA de genes celulares (c-onco). Los c-onco genes tienen complemento en v-onco genes, pero algunos proto-oncogenes han sido identificados por su asociación con tumores celulares. <sup>(8)</sup>

Las oncoproteínas celulares pueden ser derivadas de varios tipos de genes. La característica más común es que cada tipo de producto de gen está probablemente involucrado en vías que regulan el crecimiento, y la oncoproteína tiene una pobre regulación o una actividad incrementada. Receptores de factores de crecimiento localizados en la membrana plasmática están representados por versiones truncadas en v-onco genes. La mutación de genes por factores de crecimiento polipeptídicos dan origen a oncogenes debido a un receptor que ha sido activado inapropiadamente <sup>(8)</sup>. Por otra parte, los factores de muerte celular por unión a sus receptores inducen apoptosis (muerte celular programada), matando las células en cuestión de horas. <sup>(9)</sup>

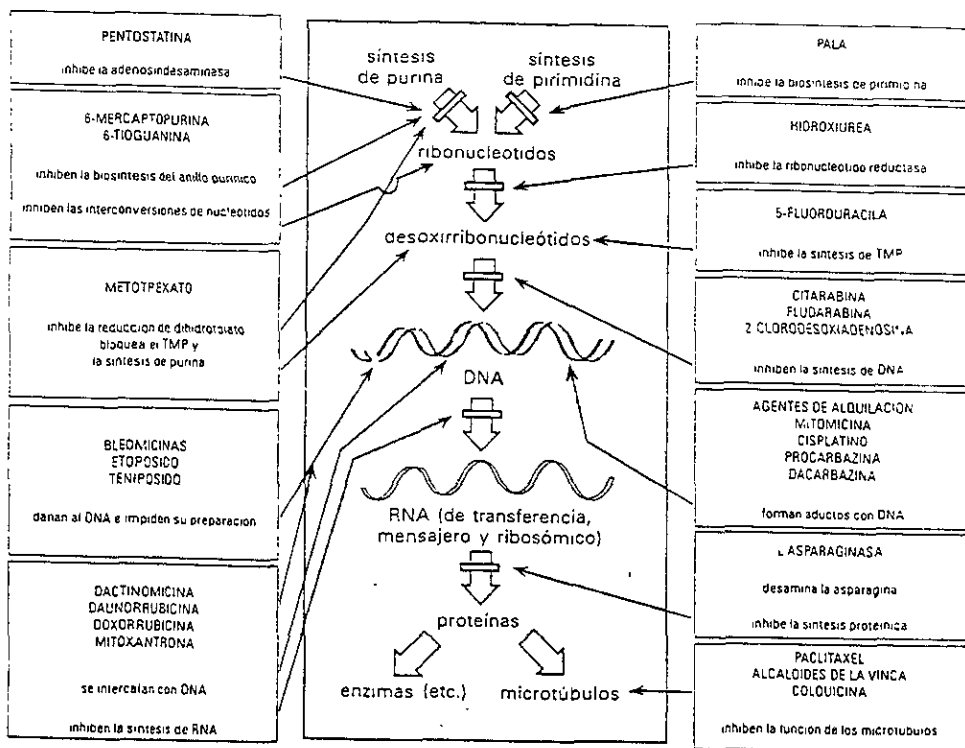
## **3.3 Quimioterapia del cáncer.**

A través de la quimioterapia las enfermedades neoplásicas malignas son tratadas y en muchos casos son curables. Existen muchos tipos de neoplasias y una amplia gama de medicamentos para su tratamiento. Para los diversos tipos

de cáncer la quimioterapia puede ser curativa, paliativa (las señales y los síntomas de la enfermedad son parcialmente abatidos por periodos de meses a años), o beneficiar marginalmente (respuestas incompletas, periodos de vida cortos).<sup>(9)</sup>

En la actualidad, los fármacos anticancerosos tienden a utilizarse en una fase más temprana del tratamiento, a menudo junto con radiación y cirugía, es entonces cuando los tumores son más curables y el paciente tiene mayor capacidad para soportar el tratamiento <sup>(11)</sup>

La siguiente clasificación ofrece un marco de referencia general para describir los diferentes tipos de fármacos.<sup>(11)</sup>



PALA = N-fosfonoacetil-L-asparato. TMP = timidinmonofosfato

Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular,<sup>(11)</sup> algunos dañan al DNA mientras que varios agentes quimioterapéuticos son conocidos por producir apoptosis y arresto del ciclo celular.<sup>(12-13)</sup>

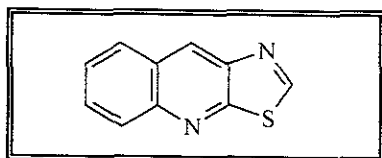
En años recientes la identificación de nuevos fármacos se ha ampliado desde el área de los productos naturales más comunes (p. ej. Paclitaxel [Taxol] y sustancias semisintéticas como el etopósido, dirigidas contra los procesos proliferativos), hasta la investigación que representa la obtención de nuevos conocimientos sobre biología oncológica.<sup>(11)</sup>

El taxol, compuesto de uso clínico con el nombre comercial de paclitaxel, se aisló originalmente de la corteza del árbol del Tejo,<sup>(11, 14)</sup> *Taxus brevifolia*,<sup>(14-15)</sup> posee efectos farmacológicos peculiares como inhibidor de la mitosis, y difiere de los alcaloides de la Vinca y los derivados de la colchicina en que estimula la formación de microtúbulos y no la inhibe.<sup>(11, 14-15)</sup> Por estimulación de la polimerización de los microtúbulos y prevención de la depolimerización, el paclitaxel interrumpe la estructura del citoesqueleto requerida para la multiplicación de las células tumorales y metástasis.<sup>(11, 14-15)</sup>

### **3.4 Compuestos derivados de quinolina.**

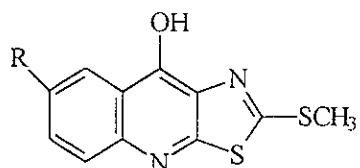
Los compuestos derivados de acridina y quinolina<sup>(16)</sup> han sido extensamente estudiados como potenciales agentes antitumorales, debido a su capacidad para unirse a DNA. Además, la quinacrina y sus derivados también han sido probados como agentes antimalariales<sup>(17)</sup> y antineoplásicos.<sup>(18)</sup> La química de dichos derivados ha recibido particular atención en los últimos años,<sup>(16)</sup> y una gran variedad de quinolinas han sido sintetizadas y probadas como agentes antimalariales,<sup>(17)</sup> antialérgicos,<sup>(18)</sup> antiinflamatorios,<sup>(19)</sup> fungicidas<sup>(20)</sup> y antivirales;<sup>(21)</sup> mostrando algunos de ellos alta actividad como agentes antibacteriales<sup>(22-23)</sup>

En 1997 surgió un nuevo concepto para la síntesis de nuevos derivados de acridinas y quinolinas. Entre estos derivados la síntesis y evaluación de las tiazolo[5,4-b] quinolinas (figura 1) rara vez han sido reportadas en la literatura. Estos compuestos han sido descritos como potenciales antiespasmódicos, antiinflamatorios y sondas fluorescentes. <sup>(2, 3, 24-26)</sup>



**Figura 1. Tiazolo[5,4-b] quinolina.**

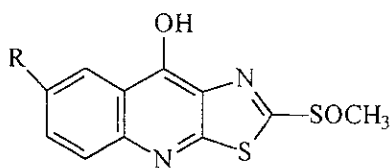
Alvarez -Ibarra y colaboradores (en 1997), reportaron la síntesis de tiazolo[5,4-b] quinolinas desconocidas y su estudio *in vitro* como agentes antitumorales potenciales. Estos derivados están relacionados estructuralmente a las quinolinas y acridinas por sustitución isostérica del residuo bencénico por un anillo de tiazol (figura 2) <sup>(2, 3)</sup>



3a R=H

3b R=Me

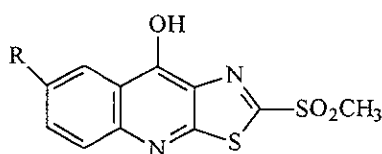
3c R=F



4a R=H

4b R=Me

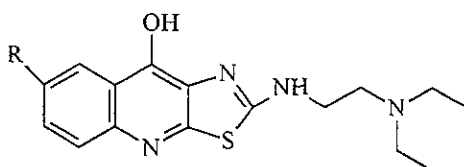
4c R=F



5a R=H

5b R=Me

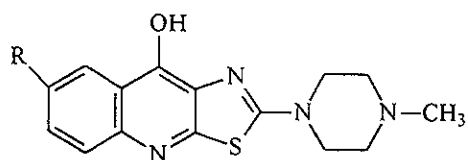
5c R=F



6a R=H

6b R=Me

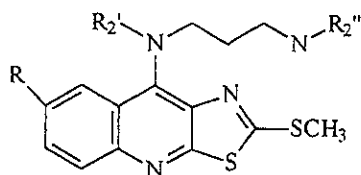
6c R=F



7a R=H

7b R=Me

7c R=F



8 R=R'=H; R''=Et

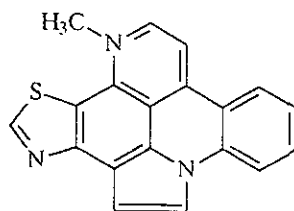
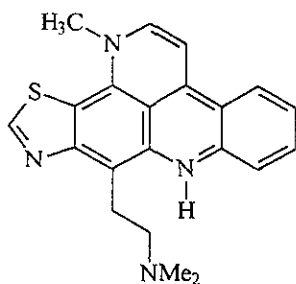
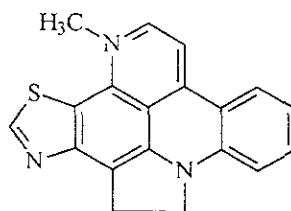
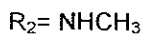
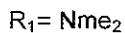
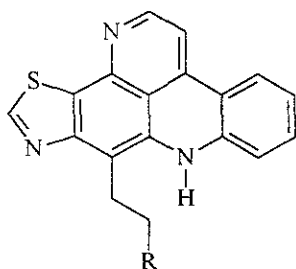
9 R=Me; R'=H; R''=Et

10 R=H; R'=R''=Me

Figura 2. Derivados de las tiazolo[5,4-b]quinolina

Los resultados biológicos obtenidos en una línea celular de neoplasma linfóide de ratón (P-388), carcinoma humano de pulmón (A-549) y tumor humano de colon (HT-29) *in vitro* para esta serie de compuestos, proveyeron información acerca de la relación estructura-actividad donde el derivado 2-[[2-(N,N-dietilamino)etil]amino]-7-fluoro-9-hidroxitiazolo[5,4-b]quinolina mostró los niveles más altos de citotoxicidad en las líneas celulares P-388y A-549; un átomo de flúor en la posición 7 o un grupo [(N,N-dietilamino)etil]amino en la posición 2, mostraron ser importantes para la inducción de una actividad antitumoral significativa; el cambio del flúor por un grupo metilo o hidrógeno mostró ser muy importante para la actividad antitumoral en las tres líneas celulares, los compuestos con la cadena -NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N- en C<sub>2</sub> no fueron efectivos contra los tres tipos de líneas celulares, o fueron menos activos; la diferencia entre los grupos [(N,N-dietilamino)etil]amino y 1-(4-piperazinil)en la posición 2 mostró ser crítica para la actividad antitumoral., el cambio del grupo [(N,N-dialquilamino)alquil]amino de la posición 2 a la posición 9 resultó en un ligero decremento de las CI<sub>50</sub>.<sup>(3)</sup>

Así también, han sido reportadas las actividades citotóxicas de una nueva clase de alcaloides de acridinas las cuales poseen un núcleo de tiazolo [5,4-b]acridina (figura 3).<sup>(3, 25-26)</sup>



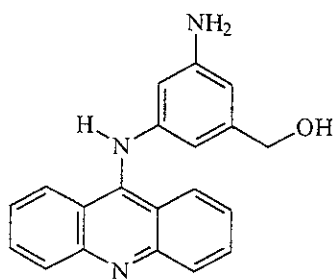
**Figura 3. Derivados naturales de tiazolo[5,4-b]quinolinas**

Por su parte, las tiazolo[5,4-b]quinolinas han mostrado una actividad antitumoral comparable a la de este tipo compuestos.<sup>(3)</sup>

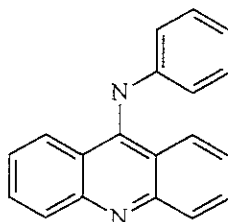
Con base a las características presentadas por los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas y considerando las características estructurales y electrónicas de la 9-anilinoacridina se han sintetizado compuestos híbridos que son propuestos como potenciales intercaladores de DNA<sup>(3)</sup> Para dicho estudio se emplearon como moléculas patrón: AHMA con alta actividad contra leucemia e



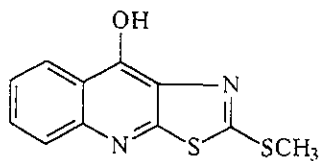
intercalador de DNA; 9-anilinoacridina que es biológicamente inactiva y posee gran capacidad como intercalador; 9-hidroxi-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina que presenta una baja actividad biológica; y, por último, la 2-(N,N-dietiletilendiamino)-9-hidroxitiazolo[5,4-b]quinolina, compuesto de gran actividad antileucémica (Figura 4).<sup>(3)</sup>



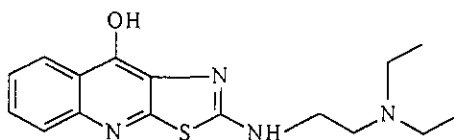
AHMA



9-anilinoacridina



9-Hidroxi-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina

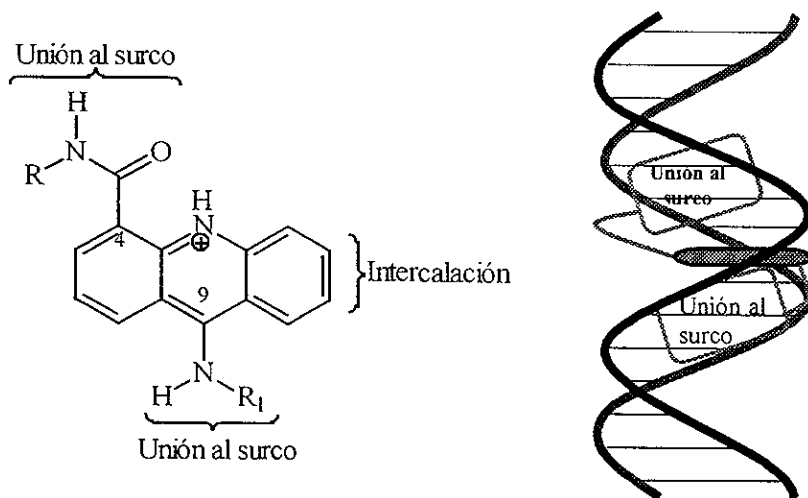


2-(N,N-Dietiletilendiamino)-9-hidroxi tiazolo[5,4-b]quinolina

**Figura 4. Estructuras moleculares empleadas como referencia en el estudio de compuestos híbridos de Tiazolo[5,4-b]quinolina y 9-anilinoacridina.**

Los modelos primarios de unión no covalente de pequeñas moléculas a DNA y RNA son intercalación, unión al surco, atracción coulombica o combinación de éstas,<sup>(27-28)</sup> es decir, por interacciones de tipo electrostático, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas<sup>(3-29)</sup> La formación del complejo es usualmente reversible.<sup>(30)</sup> La

intercalación en hebras de DNA es una unión en donde el grupo intercalante dirige sus sustituyentes en ambos surcos de manera simultánea.<sup>(27, 30)</sup> Varios compuestos han mostrado unión a DNA por dicho mecanismo, incluyendo 9-anilinoacridina-4-carboxiamidas.<sup>(27, 31)</sup> En el complejo de intercalación, los sustituyentes de acridina en las posiciones 4- y 9- son localizados en los surcos mayor o menor con el cromóforo de acridina incluido entre los pares de bases (Figura 5) <sup>(27, 32- 33)</sup>



**Figura 5. Estructura general de acridina 4,9-disustituídas y esquema de su unión a DNA de doble cadena por intercalación.**<sup>(27)</sup>

Por otra parte, el mecanismo por el cual  $R-8$  puede inducir los efectos antes descritos, sigue estando relacionado al de las moléculas patrón de las cuales es derivado, las 9-anilinoacridinas y tiazolo[5,4-b]quinolinas, conservando un sistema tricíclico planar y un anillo de 9-anilino en posición ortogonal, con base a lo cual se ha propuesto como un potencial intercalador de DNA, donde sus grupos amino tendrían un papel primordial mediante la formación de puentes de hidrógeno en una forma de intercalación similar a la esquematizada en la Figura 5.

Así también, una variedad de agentes quimioterapéuticos inhiben la topoisomerasa de DNA tipo II, incluyendo acridinas,<sup>(34)</sup> de las que se deriva el

fármaco antitumoral amsacrina cuyo mecanismo de acción involucra intercalación del cromóforo de acridina dentro del DNA e inhibición de la topoisomerasa II con la formación de un complejo ternario topoisomerasa-fármaco-DNA, (figura 6).<sup>(35-36)</sup>

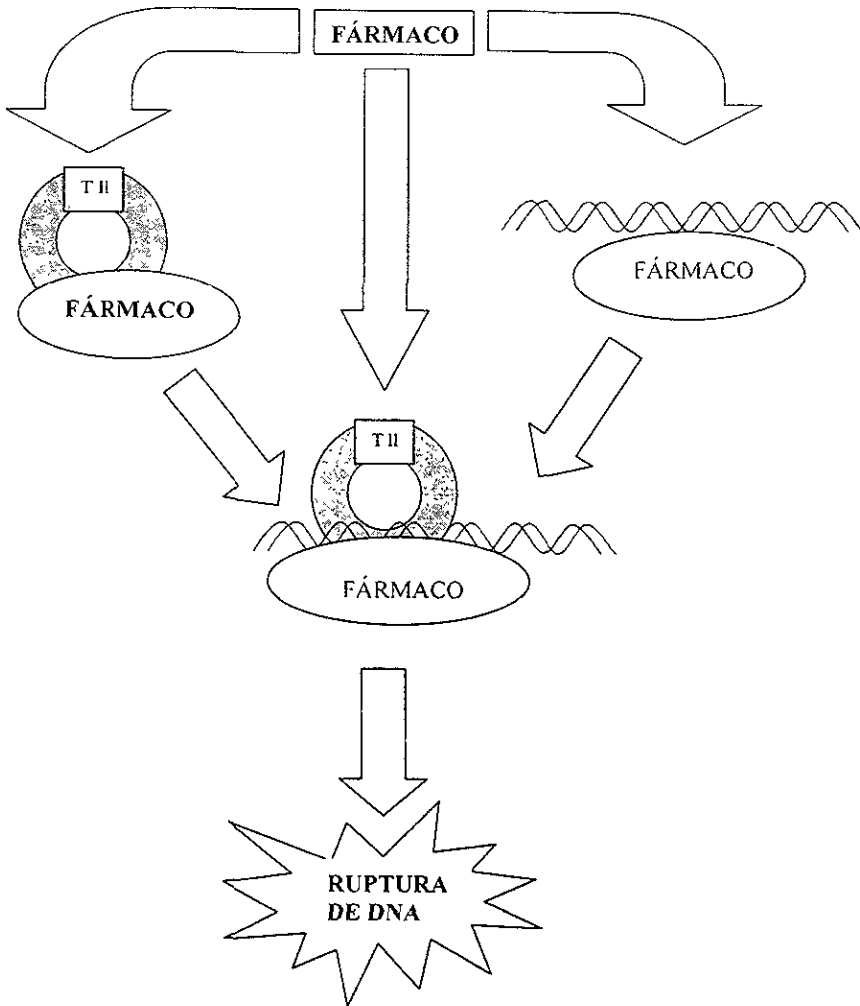


Figura 6. Formación del complejo ternario topoisomerasa-fármaco-DNA. El complejo ternario puede formarse por tres posibles rutas. El fármaco puede entrar a través de interacción con la topoisomerasa blanco (izquierda), DNA (derecha), o el complejo enzima-DNA (centro).<sup>(35)</sup> TII: Topoisomerasa II

Debido a lo anterior y siendo R-8 un compuesto que en parte deriva de 9-anilinoacridinas, puede proponerse dicho mecanismo de acción como el responsable de la citotoxicidad ejercida por R-8 en las líneas celulares tumorales

### **3.5 Apoptosis.**

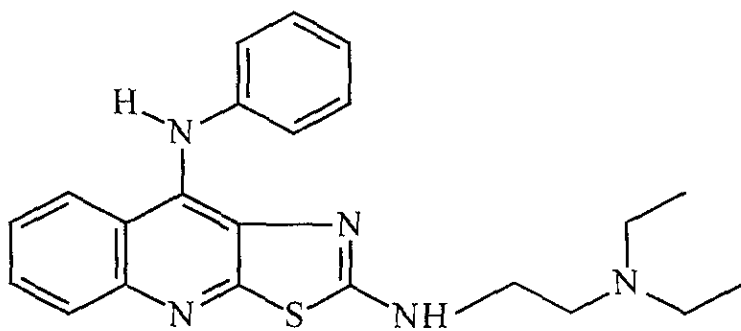
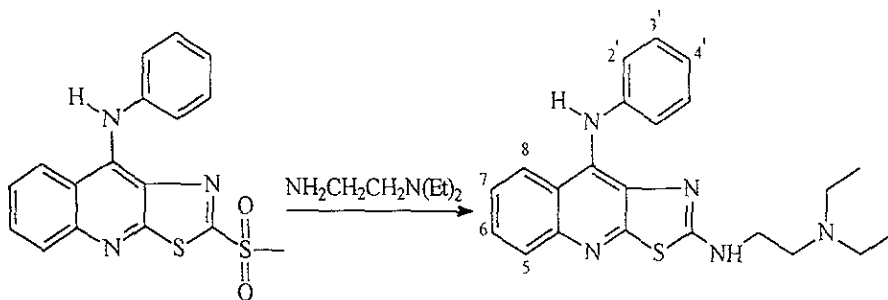
Apoptosis es un programa de muerte celular codificada genéticamente y definida por cambios característicos morfológicos y bioquímicos<sup>(37-38)</sup> Estos incluyen fragmentación de DNA, condensación nuclear de la cromatina, encogimiento celular por la pérdida de agua, empaquetamiento de los organelos celulares y una extensa superficie en forma de burbujas, lo cual es seguido por la formación de los característicos cuerpos apoptóticos, lo que promueve la remoción fisiológica de las células moribundas por fagocitos vecinos.<sup>(39-41)</sup>

Una multitud de factores modulan la inducción de apoptosis, incluyendo factores de crecimiento, mediadores intracelulares de señales de transducción, regulación por proteínas nucleares de expresión de genes, replicación de DNA, y ciclo celular.<sup>(42-44)</sup>

La apoptosis juega papeles importantes en varios sistemas biológicos, tales como la respuesta inmune, hematopoesis, desarrollo embrionario, y carcinogénesis.<sup>(45-47)</sup> La muerte celular ocurre por apoptosis durante delección programada de células y seguida a una exposición a agentes citotóxicos.<sup>(12, 47-48)</sup>

Los fármacos quimioterapéuticos causan daño al DNA y muerte a las células cancerígenas principalmente por apoptosis.<sup>(47-48)</sup> Sin embargo, los mecanismos de apoptosis inducido por el fármaco, son pobremente comprendidos.<sup>(49)</sup>

**3.6 Síntesis de la 9-anilino-2-(N,N-dietililendiamino)tiazolo[5,4-b]quinolina, llamada R-8.**



**Figura 7. Estructura del compuesto R-8.**

**(9-anilino-2-(N,N-dietililendiamino)tiazolo[5,4-b]quinolina)**

## **4. Metodología experimental.**

### **4.1 Líneas celulares empleadas.**

**HeLa** Células de carcinoma epidermal de cérvix humano que fueron aisladas de una paciente negra de 31 años de edad. Es la línea celular más ampliamente estudiada <sup>(50)</sup>

**Calo**: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, aisladas de una paciente mexicana. Esta línea ha sido descrita recientemente y se tienen pocos antecedentes <sup>(51)</sup>

**C-33**: Células de carcinoma de cérvix humano, derivada por Auersperg de una biopsia de cáncer cervical. <sup>(50)</sup>

**CHO**: Células derivadas de un subclón de células parentales CHO iniciada de una biopsia de un ovario de hamster chino adulto <sup>(50)</sup>

**SW620**: Células de adenocarcinoma de colon humano, aisladas de un hombre caucásico de 51 años de edad (Grupo sanguíneo A, Rh+) <sup>(50)</sup>

**SW480**: Células de adenocarcinoma de colon humano, aisladas por Leibovitz y colaboradores <sup>(50)</sup>

**MCF-7**. Células de adenocarcinoma de mama humano, presentan ciertas características diferenciales de las células epiteliales de mamíferos, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógenos citoplásmicos. Esta línea celular pueden contener la información del virus de papiloma tipo B o C. <sup>(50)</sup>

### **4.2 Técnicas empleadas.**

#### **4.2.1 Mantenimiento de líneas celulares.**

Todo procedimiento se realiza en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad.

Las diferentes líneas celulares se dejarán proliferar en cajas de Petri que contenían un medio de cultivo adecuado para cada una de ellas y fueron incubadas a 37°C, con 99 % Humedad Relativa (HR) y 5% de CO<sub>2</sub>. Cada medio debe cambiarse cada 3 o 4 días debido a que los detritos o restos de células impiden una adecuada proliferación de las demás células viables, por lo cual se procede de la siguiente forma

- a) Se elimina por decantación el medio contenido en la caja,
- b) Se lava con 2 a 3 mL de una solución salina amortiguada por fosfatos (PBS-EDTA) (ver sección 4.3.3) previamente atemperada y se desecha por decantación,
- c) Se agregan 5 mL del medio de cultivo nuevo de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (ver sección 4.3.1) complementado con suero fetal bovino (SFB) (GIBCO)(Ver sección 4.3.1),
- d) Por último, se colocan nuevamente en incubación en las condiciones anteriormente descritas

Todas las líneas celulares se mantienen en proliferación hasta alcanzar aproximadamente un 90% de confluencia, momento en el que puede disponerse de ellas para llevar a cabo el experimento de interés, para realizar su propagación en otras cajas ó bien para congelarlas

#### **4.2.2 Propagación de líneas celulares.**

La propagación de líneas celulares debe realizarse en condiciones de esterilidad como se mencionó antes, cuando han adquirido un por ciento máximo de confluencia en la superficie de la caja de Petri, para disponer del mayor número de células para un experimento determinado o bien para conservar el cultivo celular en nitrógeno líquido. El procedimiento a seguir se describe a continuación

- a) El medio de cultivo presente en la caja se elimina por decantación.
- b) Se lava el cultivo con solución de PBS-EDTA previamente atemperado, en un volumen aproximado de 2 a 3 mL y se elimina por decantación

- c) Se agrega una solución de PBS-EDTA previamente atemperada en un volumen aproximado de 3 mL y se incuba a 37°C, con 99% HR y 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos, para desprender las células de la superficie de la caja
- d) Una vez transcurrido el tiempo anterior, se resuspende y termina de despegar las células que no se hayan desprendido durante la incubación, con la ayuda de una pipeta Pasteur, y se traspara la suspensión a un tubo Falcon de 15 mL, y se homogeneiza la suspensión.
- e) Se transfieren alícuotas de la suspensión a cajas de Petri previamente etiquetadas, conteniendo el medio de cultivo adecuado para cada línea celular previamente atemperado, y se colocan en incubación en las condiciones antes mencionadas.

### **4.2.3 Congelación de líneas celulares.**

Esta técnica se realiza cuando se requiere preservar las líneas celulares y se realiza de la manera siguiente

- a) El medio de cultivo contenido en la caja de Petri se elimina por decantación
- b) Se realiza un lavado de la caja con solución de PBS-EDTA previamente atemperado en un volumen de aproximadamente 4 mL y se desecha por decantación.
- c) Enseguida, con la adición de aproximadamente 2 mL de solución de PBS-EDTA previamente atemperado, se mantiene en incubación por espacio de 10 minutos a 37°C, con 99% HR y 5% de CO<sub>2</sub>, para desprender las células de la superficie de la caja.
- d) Después de la incubación se resuspenden las células por medio del uso de una pipeta Pasteur con el fin de lograr el desprendimiento de las células que aún se encuentren adheridas y homogeneizar la suspensión celular



- e) La suspensión se traspasa a un tubo Falcon previamente etiquetado de 15 mL y se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos
- f) Se decanta el sobrenadante y se resuspende en el medio de congelamiento (ver sección 4.3.2),
- g) A partir de la suspensión anterior se toman alícuotas de aproximadamente 1.5 mL que fueron colocadas en criotubos previamente etiquetados
- h) Las alícuotas se congelan a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 2 horas, aproximadamente.
- i) Posteriormente se cambian y mantienen en congelación en nitrógeno líquido a  $-190^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.4 Descongelamiento de líneas celulares.**

Las diferentes líneas celulares se mantienen en congelación en nitrógeno líquido. Cuando es necesario:

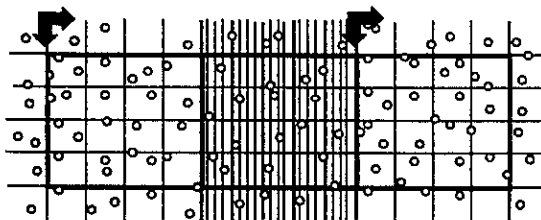
- a) Cada uno de los criotubos es descongelado al frotarlo en forma suave con las manos o al sumergirlo por cinco segundos en agua a  $37^{\circ}\text{C}$
- b) El contenido del criotubo es depositado en una caja de Petri, previamente etiquetada, conteniendo el medio de cultivo adecuado para cada línea celular (aproximadamente 5 mL), previamente atemperado, y se agita suavemente a manera de homogeneizar la suspensión.
- c) Se procede a incubar dicha caja por espacio de 2-4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , con 99% HR y 5%  $\text{CO}_2$ , esto con el fin de lograr la adhesión de las células a la superficie de la caja de Petri
- d) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se coloca la caja al microscopio para observar si tuvo éxito la adhesión, de lo contrario se desechan y se toma un nuevo criotubo para descongelar y se repite el procedimiento
- e) Si la adhesión resulto efectiva se cambia el medio de cultivo contenido en la caja de Petri desechándolo por decantación.

- f) Se lava el cultivo con un volumen aproximado de 2 a 3 mL de solución de PBS-EDTA previamente atemperada para eliminar las células muertas y el posible detritus debido al congelamiento, y se desecha por decantación.
- g) Se agregan 5 mL de medio de cultivo fresco adecuado para cada línea celular, previamente atemperado, y se incuba a las condiciones antes descritas.

#### 4.2.5 Cuantificación de células.

Las células se cuentan en una cámara de Neubauer como se describe a continuación:

- a) La cámara de recuento y su cubreobjetos se lavan y limpian con agua destilada y algodón primeramente y enseguida con etanol al 70 %.
- b) Una vez seca la cámara, con su cubreobjetos en posición, se llena con una pequeña alícuota de la suspensión celular por medio de una pipeta Pasteur.
- c) La cámara se deja reposar durante cinco minutos, a fin de que las células sedimenten.
- d) El recuento celular se realiza sirviéndose de un microscopio invertido en el cual se coloca la cámara y se lleva a cabo el conteo de células como es indicado a continuación:



- e) Deben contarse las células que se encuentran dentro de cada cuadro grande de 1 mm por lado ( formado a su vez por 16 cuadros pequeños

de 0.25 mm por lado), incluyendo aquellas que tocan el margen superior y el margen izquierdo, es decir en forma de una letra L invertida, tal como lo indican las flechas en el esquema y omitiendo las células que tocan el margen inferior y derecho; esto se realiza con el fin de que las células ubicadas en las líneas marginales puedan ser consideradas para el recuento con una misma probabilidad.

- f) La cámara de Neubauer posee ocho cuadros grandes como los dos mostrados en el esquema anterior, por lo cual deben contarse el total de células presentes en cada uno de ellos y obtener el promedio de células por cuadro.
- g) Si la cantidad de células contadas en las dieciséis cuadrículas pequeñas de cada cuadro es similar, denota homogeneidad en la suspensión. De no ser así, debe repetirse el conteo a partir de una nueva alícuota, previa resuspensión de las células de la muestra, evitando cualquier error tanto en la toma como en la colocación de dicha alícuota.
- h) Finalmente, el número promedio obtenido a partir del conteo es multiplicado por un factor de  $1 \times 10^4$ , de tal manera que la cantidad resultante representa el número de células presentes en un mililitro de suspensión celular.

#### **4.2.6 Cinética de acción de R-8 en la inhibición de la proliferación celular.**

Este experimento se realizó por cuadruplicado en tres experimentos. Se utilizaron células HeLa. Se emplearon placas de 96 pozos, conteniendo un número de células inicial de  $4 \times 10^3$  células por pozo. Se evaluaron como controles negativos las células solas, así como también las células tratadas con el mismo volumen de dimetilsulfoxido (DMSO) empleado en disolver el compuesto R-8. El taxol se utilizó como control positivo disuelto en DMSO en una concentración final  $0.25 \mu\text{M}$  por pozo. El compuesto R-8 se empleó en una concentración final de  $20 \mu\text{M}$  por pozo. Tanto el R-8, como el taxol y el disolvente fueron adicionados 24 h

después de iniciado el cultivo celular, y a partir de este momento se realizaron cosechas de células a las 8, 24, 32, 44 y 52 horas, y se determinó en ellas la viabilidad celular utilizando una modificación del método de Mosmann,<sup>(52)</sup> el cual será descrito con detalle en la siguiente sección.

#### **4.2.7 Técnica del MTT para medir la viabilidad celular.**

Mosmann describió esta técnica semiautomatizada en 1983.<sup>(53)</sup> Posteriores reportes han descrito modificaciones a ese procedimiento para estudiar la respuesta celular tumoral para agentes quimioterapéuticos.<sup>(52)</sup>

Esta técnica emplea el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, también conocido como MTT, el cual es un compuesto de color amarillo que al ser reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables produce un compuesto de color azul.<sup>(53)</sup> El formazán formado se disuelve completamente en DMSO y absorbe a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 540 nm, siendo directamente proporcional el número de células viables a la lectura de absorbancia.<sup>(53, 54-56)</sup>

Esta técnica colorimétrica muestra varias ventajas entre las que se encuentran las siguientes:

- Es un ensayo simple, versátil y cuantitativo, lo cual representa ventajas sobre las técnicas tradicionales usadas para detectar la proliferación celular y los ensayos de citotoxicidad.<sup>(53)</sup>
- Es sensible y reproducible para medir el crecimiento celular, y la sensibilidad a fármacos de diversas estirpes celulares.<sup>(57)</sup>

Técnica.

Una vez sometido el cultivo celular al tratamiento con el compuesto a probar (R-8) como se describió en la sección 4.2.6, se procede a lo siguiente:

- a) Las células de cada pozo son resuspendidas con una micropipeta y colocadas en tubos Eppendorf con capacidad de 1.5 mL.

- b) Cada pozo se lava con un volumen aproximado de 25  $\mu\text{L}$  de solución de PBS-EDTA previamente atemperada, misma que se traspasa enseguida a cada uno de los tubos mencionados en el inciso anterior.
- c) Nuevamente, se adiciona solución de PBS-EDTA, previamente atemperada, a cada pozo en un volumen aproximado de 50  $\mu\text{L}$  y se colocan en incubación a 37°C, con 99% HR y 5%  $\text{CO}_2$  por espacio de 10 minutos con el fin de despegar las células adheridas a la superficie de la caja de Petri
- d) Transcurrido el tiempo de incubación, se resuspenden las células de cada pozo con la ayuda de una micropipeta para terminar de desprender las células que aún se encuentren adheridas, y la suspensión se transfiere a su respectivo microtubo.
- e) Los procedimientos de los incisos c) y d) se repiten una vez mas, y al término de ello la suspensión de células se centrifuga a 1 500 rpm por un lapso de 5 minutos.
- f) El sobrenadante de cada tubo se elimina por decantación y se agregan 250  $\mu\text{L}$  de medio D-MEM fresco, previamente atemperado, y se resuspenden las células.
- g) Se adicionan 20  $\mu\text{L}$  de una solución de MTT (5 mg/mL), se mezcla y se incuban a 37°C, con 99% HR y 5%  $\text{CO}_2$ , durante 3 h, periodo durante el cual se lleva a cabo la reducción del anillo de tetrazolio en las células viables.
- i) Al concluir el periodo de incubación, se centrifuga a 6 000 rpm durante 6 minutos.
- j) El sobrenadante obtenido es eliminado por decantación y se agrega DMSO en un volumen de 250  $\mu\text{L}$ , se resuspende la solución y se lee a una  $\lambda$  de 540 nm en un espectrofotómetro DYNEX MRX.

### **5.2.8 Inhibición de la incorporación de Timidina-[C<sup>14</sup>] a DNA.**

Esta prueba se llevó a cabo por cuadruplicado en tres diferentes experimentos; las líneas celulares empleadas fueron SW-480, SW-620, C-33, Calo HeLa, CHO y MCF-7. Se emplearon placas de 96 pozos, conteniendo un número de células inicial de  $5.5 \times 10^3$  células por pozo. El compuesto R-8 se empleó en una concentración final de 20  $\mu\text{M}$  por pozo, y fue agregado a las 24 horas de iniciado el cultivo celular, al igual que el control del disolvente. Tiempo después, a las 54 horas de iniciado el cultivo celular se agregó timidina-[<sup>14</sup>C] a una concentración de 0.2  $\mu\text{Ci}$  por pozo. Transcurridas 72 horas a partir del inicio del cultivo celular se realizó la cosecha de las células empleando el Skatron Instruments Cell Harvester. Las membranas fueron colocadas en un sitio oscuro para secarse a temperatura ambiente y, una vez logrado lo anterior, se procedió a efectuar el conteo de la radioactividad utilizando un contador de centelleo en líquido (Betaplate Wallac 1205).

### **5.2.9 Citometría de flujo.**

El experimento se llevó a cabo en células HeLa; para ello se utilizaron cajas de Petri previamente etiquetadas, en las cuales se tiene un número inicial de  $1 \times 10^6$  células tratadas con R-8 y como control se usaron las células con el disolvente.

Al cabo de 24 h de haber iniciado el cultivo celular se agregó el compuesto R-8 a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  y el disolvente para el control. A partir de este momento se realizaron cosechas de células a las 4, 24 y 48 horas. Una vez cosechadas las células son fijadas en etanol al 70 % y se guardan en refrigeración, hasta completar cada una de las cosechas y tener disponibles todas las muestras. Posteriormente todas las muestras fueron tratadas de manera consecutiva con las siguientes soluciones: 1  $\mu\text{L}$  de Triton X100 al 0,5 % a 4°C, 10  $\mu\text{L}$  de RNasa (10  $\mu\text{g}$  / mL GIBCO) a 4°C y 1 mL de bromuro de etidio (50  $\mu\text{g}$  /

mL), a fin de ser analizadas por un citómetro de flujo Coulter Epics. Las células son contadas y ubicadas en las diferentes fases del ciclo celular con base a la intensidad de fluorescencia producida por el bromuro de etidio al asociarse con el DNA.<sup>(39)</sup>

### **4.3 Preparación de soluciones.**

#### **4.3.1 Medio de cultivo.**

##### **Medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM).**

Todo procedimiento se realiza en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad y en el menor tiempo posible para que las células resulten menos afectadas.

- a) En un vaso de precipitados de 1L, adicionar 700 mL de agua desionizada seguido de:
  - Un sobre de medio D-MEM (GIBCO),
  - MEM solución de aminoácidos (GIBCO) 10 mL
  - Antibiótico-antimicótico (GIBCO) 10 mL
  - HEPES (SIGMA) 2.2 g
  - Piruvato (GIBCO) 10 mL
  - NaHCO<sub>3</sub> (BAKER) 3.7 g
- b) La solución se agita hasta la disolución total.
- c) Se ajusta el pH a 7.4
- d) Con agua desionizada se lleva a un volumen aproximado de 900 mL.
- e) Dicha solución se esteriliza mediante membrana millipore de 22 ó 45 µm.
- f) El medio así obtenido, es complementado con 100 mL de SFB (GIBCO) y se agita hasta homogeneizarlo.

- g) Se coloca una alícuota en la incubadora a 37°C, 99% HR y 5% CO<sub>2</sub> para control de la esterilidad.
- h) El medio D-MEM complementado se mantiene en refrigeración con una duración de un mes y el SFB congelado.

#### **4.3.2 Medios de congelamiento.**

**Medio A.** (Para las líneas celulares HeLa, Calo, SW620, SW-480).

- a) En un recipiente estéril se adiciona el medio de cultivo adecuado para cada línea celular sin complementar con SFB.
- b) Se agrega a la solución anterior glicerol estéril 15% v/v, y se mezclan.
- c) La solución resultante se almacena a -20°C.
- d) Cuando sea requerido, el medio debe descongelarse y utilizarse tan pronto como sea posible

**Medio B.** (Para línea celular MCF-7)

Para células que son más exigentes en cuanto a sus requerimientos nutricionales, como en el caso de las células MCF-7, el medio de congelamiento a usarse está constituido por:

- Suero fetal bovino ( SFB GIBCO) inactivado.
- Dimetilsulfóxido (DMSO MALLINCKRODT) en un 8% v/v.
- El SFB y el DMSO se mezclan y la solución resultante se almacena en recipientes estériles a -20°C

#### **4.3.3 Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS)- Acido etilendiaminotetracético (EDTA).**

Para preparar un litro de solución:

- a) En un vaso de precipitados de 1 L se agregan 900 mL de agua desionizada y se disuelven en ella las siguientes sales en la cantidad indicada para cada una.



- NaCl (BAKER) 80 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (SIGMA) 0.24 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (BAKER) 1.44 g
  - KCl (MERCK) 0.2 g
  - Ácido etilendiaminotetracético ( EDTA BAKER) 0.372 g
- b) Se ajusta el pH a 7.4
- c) La solución se trasvasa a un matraz volumétrico de 1 L donde se afora empleando agua desionizada y se mezcla.
- d) Se transfieren alícuotas de dicha solución a varios recipientes limpios.
- e) Se esterilizan en la autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### **4.3.4 Solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).**

Es importante emplear guantes y cubrebocas, pues el MTT es tóxico

Para preparar 10 mL de solución.

- a) En un vaso de precipitados conteniendo 10 mL de solución salina isotónica se disuelven 50 mg de sal de bromuro de tetrazolio (SIGMA).
- b) La solución se esteriliza por filtración en membrana millipore de 0.45  $\mu$ .
- c) El recipiente que contenga la solución de MTT debe ser envuelto en papel aluminio para protegerla de la luz.
- d) Dicha solución se almacena en refrigeración a 4°C, y permanece estable por un periodo de un mes.

#### **4.3.5 Solución salina isotónica.**

Para preparar 10 mL de solución:

- a) En un matraz volumétrico de 10 mL se disuelven 85 mg de NaCl (BAKER) con agua desionizada, se afora y se mezcla.

- b) La solución se reparte en alícuotas y se esteriliza en la autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup>, durante 15 minutos
- c) Se almacena a temperatura ambiente o en refrigeración

#### **4.3.6 Solución de Triton-X100 0.5%.**

Para preparar 10 mL de esta solución.

- a) En un matraz volumétrico de 10 mL se agregan 50  $\mu$ L de solución de Triton X100 (SIGMA).
- b) Se afora adicionando agua desionizada, y se mezcla.
- c) La solución resultante se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL .
- d) Se guarda dicha solución en refrigeración.

#### **4.3.7 Solución de Bromuro de Etidio 50 $\mu$ g / mL.**

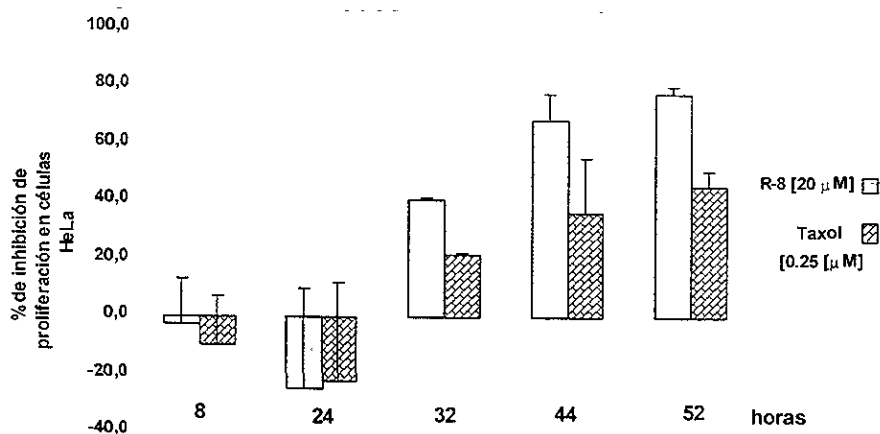
Para preparar 50 mL de solución:

- a) En un matraz volumétrico de 50 mL se colocan 2.5 mg de bromuro de etidio (SIGMA).
- b) Se agrega agua desionizada para disolver dicho reactivo, se afora y se procede a mezclar.
- c) La solución final se transfiere a un tubo Falcon de 15 mL.
- d) Esta solución se almacena a temperatura ambiente.

## 5. Resultados.

### 5.1 Cinética de acción de R-8 en la inhibición de la proliferación celular.

Con el objeto de establecer los tiempos de acción del compuesto R-8 en la proliferación celular, se determinó la cinética de inhibición sobre la línea celular HeLa, la cual ha demostrado una gran sensibilidad al compuesto R-8 en estudios preliminares.<sup>(4)</sup> Los resultados son presentados en la gráfica 1



**Gráfica 1. Cinética de inhibición de R-8 en células HeLa. Las células se crecieron durante 24 horas, al término de las cuales se agregó el compuesto R-8 y taxol.**

De acuerdo a lo observado en la gráfica 1, de 8 y hasta 24 h no hay una inhibición significativa en la proliferación celular. Posteriormente a partir de 32 h de iniciado el tratamiento, el efecto antiproliferativo del compuesto R-8 muestra un claro ascenso hasta alcanzar su máximo a las 52 h. Después de ese punto la inhibición es menos notoria, mostrándose una fase de meseta que se prolonga hasta las 72 h de evaluación de dicho tratamiento (datos no mostrados). Como puede apreciarse, resultados similares son obtenidos para el caso del taxol, evaluado bajo las mismas condiciones, pero a diferente concentración

**5.2 Inhibición de la incorporación de Timidina-[C<sup>14</sup>] a DNA.** Con el fin de evidenciar la inhibición de la síntesis de DNA producida por el compuesto R-8 en diferentes líneas celulares se midió la incorporación de timidina-<sup>14</sup>C. Los resultados son presentados en la Tabla 1

Línea celular	R-8 [20 μM] % Inhibición de DNA
SW620	59,35 ± 9,30
SW480	55,63 ± 2,96
C-33	44,43 ± 9,64
Calo	45,64 ± 5,25
HeLa	78,97 ± 3,77
CHO	80,87 ± 2,01
MCF-7	80,85 ± 1,21

Tabla 1. Inhibición de la incorporación de timidina-C<sup>14</sup> al DNA de diferentes líneas celulares por el compuesto R-8 a una concentración 20 μM después de 48 horas de incubación. (% ± D.E.)

Se demuestra que el compuesto R-8 tiene un efecto inhibitor significativo sobre la incorporación de timidina-C<sup>14</sup> al DNA en las diferentes líneas celulares empleadas, efecto que oscila entre 45-80% de inhibición; siendo más acentuado para las líneas celulares HeLa, CHO y MCF-7, y menor para las líneas celulares SW620, SW480, C-33 y Calo. Estas últimas se presentan por separado en la tabla 2 mostrando el efecto inhibitor del taxol evaluado bajo condiciones similares pero a diferente concentración.

Línea celular	R-8 [20 $\mu$ M] (%)	Taxol [0.25 $\mu$ M] (%)
SW620	59.35 $\pm$ 9.30	53.04 $\pm$ 11.89
SW480	55.63 $\pm$ 2.96	30.16 $\pm$ 5.28
C-33	44.43 $\pm$ 9.64	22.32 $\pm$ 14.17
Calo	45.64 $\pm$ 5.25	55.07 $\pm$ 10.51

Tabla 2. Inhibición de la incorporación de timidina- $^{14}$ C a DNA por R-8 a una concentración 20  $\mu$ M en diferentes líneas celulares. Como control positivo se utilizó por taxol a una concentración de 0.25  $\mu$ M. Incubación de 48 horas. (%  $\pm$  D.E.)

Con R-8 la incorporación de timidina- $^{14}$ C a DNA en las líneas celulares SW620 y SW480 se ve inhibida por más de un 50%, sin haber gran diferencia entre éstas, mientras que el taxol sí hace diferencia entre ellas, con una inhibición por arriba de 50% para las células SW620 y un 30% para SW480. En el caso de R-8 las líneas celulares C-33 y Calo presentan una inhibición ligeramente por debajo del 50%, en porcentaje similar para ambas, en tanto que taxol produce una diferencia notable (mayor a un 30%) entre la inhibición sobre C-33 y la inhibición en Calo

**5.3 Análisis de Citometría de flujo.** Basados en el hecho de que diversos fármacos anticancerígenos inducen arresto del ciclo celular,<sup>(12, 58-59)</sup> y con el objeto de saber qué fase de dicho ciclo es alterada por el R-8 se llevó a cabo un experimento de citometría de flujo utilizando células HeLa y se comparó con otro realizado en condiciones control

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas como el porcentaje de células identificadas en cada una de las fases a los diferentes intervalos de tiempo (4, 24 y 48h)

**Tabla 3****4 horas**

	Fase G1	Fase S	Fase G2
Control	30.95	17.98	51.06
R-8	32.32	22.53	45.14

**Tabla 4****24 horas**

	Fase G1	Fase S	Fase G2
Control	36.33	27.59	36.07
R-8	28.24	21.74	49.50

**Tabla 5****48 horas**

	Fase G1	Fase S	Fase G2
Control	17.50	28.39	54.10
R-8	4.40	3.91	91.67

Tablas 3, 4 y 5. Efecto de R8 en las fases G1, S y G2-M del ciclo celular de células HeLa en función del tiempo. Porcentajes de células en las fases G1, S y G2-M del ciclo celular, a 4, 24 y 48 h de tratamiento con R-8 [20  $\mu$ M]. Como control se utilizó las células sin tratamiento a los tiempos indicados.

A las 4 y 24 h después de haber agregado el R-8 las células no presentan cambios importantes en la distribución en las diferentes fases si se compara con el cultivo control.

Las células tratadas con R-8 a las 48 h presentan en G2-M un 90%. Por lo que es claro que R8 detiene a las células en la fase G2M.

## 6. Discusion.

Actualmente, el cáncer es una enfermedad que puede ser controlada y curable en algunos casos, por lo cual los fármacos antineoplásicos conocidos, juegan sin duda alguna, un papel fundamental para mejorar la calidad de vida de pacientes con esa enfermedad. Es de suma importancia la búsqueda de nuevos y mejores agentes quimioterapéuticos, de origen natural o sintético, con el objeto de obtener fármacos con mejores propiedades y menores efectos secundarios. En el presente trabajo, se estudiaron algunos aspectos del comportamiento del compuesto 9-anilino-2-(N,N-dietiletilendiamino)tiazolo[5,4-b]quinolina llamado R-8, como un posible agente anticancerígeno, cuya acción ha sido evaluada mediante pruebas biológicas *in vitro*, utilizando varias líneas celulares de cáncer humano.

La cinética de acción tanto de R8 como de taxol en células HeLa, no muestra efecto inhibitorio de la proliferación celular en un periodo inicial de tratamiento, antes bien se presentan niveles mínimos de proliferación celular durante las primeras 24h, tiempo necesario para que se produzca un daño efectivo al interior de las células que logre inhibir su progresión a través del ciclo celular impidiendo la división y multiplicación de ellas. Posteriormente, el efecto inhibitorio es efectivo y aumenta significativamente de 32 hasta 52 h, especialmente para el caso del R-8 (80% de inhibición), demostrando en forma similar al taxol, pero a diferente concentración, una gran capacidad como inhibidor de la proliferación celular *in vitro*.

Otro de los objetivos de este trabajo fue conocer las características de la muerte celular programada, apoptosis, la cual puede ser inducida por la acción de diferentes fármacos antineoplásicos, como en el caso del taxol, compuesto usado en la clínica y que en el presente estudio fue empleado como un control positivo de una inhibición de la proliferación celular.

La inhibición de la síntesis de DNA producida por R-8 se demostró mediante la incorporación de timidina-<sup>14</sup>C a DNA, empleando las líneas celulares SW620, SW480, C-33, Calo, HeLa, CHO y MCF-7. La inhibición de la síntesis de DNA, fue del orden de 45% hasta un 80%, aproximadamente. En el caso de las

líneas celulares C-33 y Cafo, presentaron el menor porcentaje de inhibición, esto pudo ser debido a cierta resistencia de las líneas celulares a la acción de R-8, lo que sugiere una menor sensibilidad con respecto a las otras líneas celulares utilizadas en este trabajo. En cuanto a las otras líneas celulares, todas mostraron inhibición de la síntesis de DNA mayor al 50%. En los casos de las líneas HeLa, CHO y MCF-7, estas mostraron ser más sensibles al inhibidor, presentando inhibiciones cercanas al 80%.

El análisis por citometría de flujo de las diferentes fases del ciclo celular en células HeLa tratadas con R-8, *no muestra cambios importantes en la cantidad de células ubicadas en las diferentes fases durante las primeras 24 h de tratamiento, ocurriendo esto en forma similar con las células control. Lo que resulta de gran trascendencia, es el 90% de incremento de células en la fase G2-M tras 48 h de incubación con el R-8*

*Resultados reportados en relación con alteraciones en el ciclo celular, en líneas celulares tratadas con fármacos demostraron que en líneas celulares leucémicas CEM y MOLT-4 tratadas con etopósido el 80% de células estaba en la fase G2-M durante las primeras 24 h de tratamiento, y a las 48 h muestran muerte celular apoptótica (evidenciada por un menor número de células en fase G1) <sup>(13)</sup> El tratamiento de las células A549 de cáncer de pulmón humano con altas dosis de paclitaxel (100 nM) produce un arresto de las células en la fase G2-M, deteniendo la progresión del ciclo celular. <sup>(60)</sup>*



## 7. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo establecieron la actividad antiproliferativa (45-80%) del compuesto 9-anilino-2(N,N-dietiletilendiamino) triazol[5,4-b]quinolina (R-8), a una concentración 20  $\mu\text{M}$ , en las líneas celulares empleadas. Se identificó el tiempo al cual se obtiene la máxima actividad antiproliferativa, que fue a 52 horas. Además se demostró la inhibición de la síntesis del DNA por efecto del compuesto. Por otro lado se determinó las fases del ciclo celular en las cuales las células son inhibidas durante el tratamiento con R-8, observándose detención de las células en la fase G2-M, después de la cual podrían, ya sea, progresar a través de la mitosis hasta alcanzar la fase G0 o G1, o bien, experimentar una muerte celular mitótica o apoptosis.

De todo lo anterior puede concluirse que R-8 presenta una actividad antiproliferativa significativa en las diferentes líneas celulares tumorales tratadas. Este compuesto podrá ser evaluado en otras fases, por ejemplo en animales para saber si presente actividad antitumoral, así como conocer su mecanismo de acción citotóxica.

## **8. Perspectivas.**

El cáncer actualmente es curable en algunos casos, pero la gran mayoría solamente son controlados, todo lo cual depende de varios factores como son el nivel socioeconómico del paciente, pues los fármacos empleados en el tratamiento de esta enfermedad son largos y costosos. Es importante señalar que el hecho de que la enfermedad sea detectada a tiempo para ser combatida ya sea por radioterapia y/o quimioterapia, o algún otro tipo de tratamiento es de vital importancia.

En el caso de la quimioterapia la combinación de los medicamentos elegidos depende del tipo de neoplasia del paciente y generalmente provocan una serie de efectos secundarios que son muy desgastantes para el organismo

Basándose en lo anterior, es necesario buscar nuevos medicamentos con mejores propiedades que puedan proveer una opción para aligerar los efectos secundarios o que sean más accesibles de adquirir desde el punto de vista económico. Compuestos como R-8 deberán ser considerados y evaluados posteriormente en otras etapas con el fin de determinar la factibilidad de incluirlos en los tratamientos en la clínica hospitalaria, con la esperanza de poder brindar una cura a muchos de los pacientes que aquejan tal enfermedad.

## 9. Abreviaturas.

col	colaboradores
CI <sub>50</sub>	Concentración del compuesto que produce 50% de inhibición del crecimiento celular
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.E.	Desviación estándar
D-MEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fase G0	Fase del ciclo celular en donde las células se encuentran en un estado no proliferativo
Fase G1	Fase del ciclo celular se encuentra entre el espacio entre la división celular y la síntesis de DNA
Fase G2	Fase del ciclo celular que refiere al espacio entre la síntesis de DNA y la división celular
HTLV-I	Células T de leucemia humana
HIV-I	Virus de inmunodeficiencia humana
H.R.	Humedad relativa
h	horas
Hepes	Ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico
in <sup>2</sup>	Pulgadas cuadradas
λ (lamda)	Longitud de onda
L	Litros
lb	Libras
mL	Mililitros
MTT	Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
μL	Microlitros
μg	Microgramos

$\mu$	Micrometro
$\mu\text{Ci}$	Microcuries
$\mu\text{M}$	Micromolar
Fase M	Mitosis Fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células
PBS-EDTA	Solución salina amortiguadora por fosfatos
RNA C	Ácido ribonucleico viral
rpm	Revoluciones por minuto
Fase S	Fase del ciclo celular durante la que se realiza la <i>síntesis</i> de DNA
SFB	Suero Fetal Bovino
Timidina- $^{14}\text{C}$	Timidina marcada con carbono catorce
v/v	Peso por ciento en volumen

## **10. Bibliografía.**

- 1.- Katzung, B. G., Farmacología básica y clínica. Universidad de California, Sn Fco., Ed. El Manual Moderno, 5ª ed., México, pp 965-966, (1994).
- 2.- Alvarez-Ibarra, C., et al., Synthesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. J. Med. Chem. 40: 668-676, (1997)
- 3.- Rodríguez, L M P., Síntesis de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina como potenciales intercaladores de DNA. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias, Facultad de Química, U.N.A M. (2000).
- 4.- Lira, R A., et al., Design, synthesis and evaluation of thiazolo[5,4-b]quinolina derivatives as potential antitumorals. Pharmaceutical Congress of the Americas. Orlando Florida, U.S.A March (2001).
- 5.- Rivera, L R V., Detección de la actividad antitumoral de fármacos tipo heparán sulfato en líneas celulares tumorales. Tesis profesional, Facultad de Química, U.N.A.M (1995).
- 6.- Clement, A., et al., Cell cycle regulation and growth, Comprehensive textbook of oncology. Volume one, Moossa, AR., et al, Ed. Willians & Wilkins, 2ª ed., U.S.A., pp 6-13 (1991).
- 7.- Doyle, A., et al., Overview of normal and cancer cell biology, Comprehensive textbook of oncology. Volume one, Moossa, AR., et al., Ed Willians & Wilkins, 2ª ed., U S.A., pp 3-5 (1991)
- 8.- Lewin, B., Genes. Parte 7: Cell growth, cancer and developement, 37. Oncogenes and cancer Oxford University Press U.S A., pp 1169-1171, (1997)
- 9.- Nagata, S., Apoptosis by Death Factor. Cell. 88: 355-365, (1997)
- 10.- Riggs, C., et al., Principles of cancer chemotherapy, Comprehensive textbook of oncology. Volume one, Moossa, AR., et al., Ed. Willians & Wilkins, 2ª ed., U S.A., pp 527-536 (1991).
- 11.- Goodman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, Vol 2, Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas, Introducción. Ed. McGraw-Hill Interamericana, 9ª ed., México, pp 1301-1308 (1996).

- 12.- Kim, D., et al., Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication *Int. J. Cancer.* 87: 629-636, (2000).
- 13.- Sleiman, R.J., et al., Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clin. Cancer Res* 6: 3756-3765, (2000)
- 14.- Wani, M.C., et al., Plant antitumoral agents.VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.*, 93: 2325-2327, (1971).
- 15.- Kohn, E.C., et al., Dose-Intense taxol: high response rate in patients with platinum resistant recurrent ovarian cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 89: 18-24, (1994).
- 16.- Denny, W.A., In: *The chemistry of antitumor agents*, Eds. Wilman, D. E. V; Blackie Glasgow, pp 1-29, (1990).
- 17.- Peacocke, A R., In *the heterocyclic compounds: The acridines*; Ed. Acheson, R. M., Wiley Interscience: New York, (1973)
- 18.- Cain, B F., et al., Potential antitumor agents. 17 9-Anilino-10-methylacridinium Salts *J. Med. Chem.* 19 772-777, (1976)
- 19.- Stotnichi, S. J., et al., Preparation of pyrazolo[4,3-c]quinolines as antiinflammatories. U.S. Patent 4,748,246, (1988)
- 20.-Schubert, J., et al., Preparation of 2- anilinoquinolines as agrochemical fungicides. *Ger Offen DE* 3, 716, 512 (1988).
- 21.- Bell, R M., et al., Preparation of pyrazolo[3,4-b]quinolines as antiviral agents. U.S. Patent 4, 920,128, (1990).
- 22.- Suzuki, N., et al., Synthesis of antimicrobials agents. Y. Synthesis of antimicrobial activities of thiazoloquinoline derivatives. *Chem Pharm Bull* 27. 1-11 (1979).
- 23.- Domory, R., et al., Synthetic chemotherapeutics agents Y Synthesis of 2.substituted thiazolo[5,4-f]quinoline derivatives., *Chem. Pharm Bull.* 24: 130-136, (1976).
- 24.- Tanasescu, Y., et al., Thiazoloquinolines. II Thiazolo[5,4-b]quinoline substituted in the thiazole ring *Chem. Ber* 90. 1295-1299, (1957)

- 25.- Sabata, B. K., et al., Antispasmodic compounds J. Proc. Inst. Chem 32 147-150, (1960).
- 26.- Kiprianova, L. A., et al., Benzothiazolyalkanoic acids and their derivatives. VI. condensation of 2- amino-1-thionhaptol and 3-amino-2-mercaptoquinoline with the anhydrides of dibasic carboxylic acids. Ukr. Khim. Zh. 30: 859-862, (1964).
- 27.- Carlson, C. B., et al., Solid- phase syntesis of acridine- based threading intercalator peptides. Bioor Med Chem Lett 10: 1979-1982, (2000).
- 28.- Bogdan, F. M., et al., A structural basis for RNA-ligand interacions, Chem. Rev. 97: 1489-1513, (1997).
- 29.- Hansh, C.; Comprehensive medicinal chemistry; Pergamon Press. 2: pp 10.1, (1990).
- 30.- Liaw, Y.-C., et al., Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both brooves simultaneously. molecular structure of nogalamycin –DNA complex. Biochemistry. 28: 9913-9918, (1989).
- 31.- Wakelin, L. P. G., et al., Kinetic and equilibrium binding studies of Amsacrine-4carboximides: A class of asymmetrical DNA -intercalation agents which bind by threading through the DNA helix. J. Med. Chem. 33: 2039-2044, (1990).
- 32.- Todd, A. K., et al., Major groove binding and 'DNA-induced' fit in the intercalation of a derivate of the mixed topoisomerasa I / II poison N-(2-(dimethylamino) ethyl) acridine-carboxiamide (DACA) into DNA; X-ray structure complexed to d(CG(5-BrU)ACG)<sub>2</sub> at 1.3-Å resolution. J. Med Chem 42: 536-540, (1999).
- 33.- Adams, A , et al., Crystal structure of the topoisomerasa II poison poison ) 9-amino-[N-(2 dimethylamino)ethyl]acridine-4-caboximide bound to the DNA hexanucleotide d(CGTACG)<sub>2</sub>. Biochemistry 38: 9921-9933, (1999).
- 34.- Huff, A. C., et al., Evidence for a common mechanism of action for antitumor and antibacterial agents that inhibit type II DNA topoisomerases. J. Biol. Chem. 265: 20496- 20505, (1990).
- 35.- Froelich, A. S. J., et al., Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. J. Biol. Chem. 270: 21429-21432, (1995).

- 36.- Rene, B , et al., The 1'-substituent on the anilino ring of the antitumor drug amsacrine is a critical element for topoisomerase II inhibition and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 49: 343-350, (1996).
- 37.- Farhana, A et al., Apoptotic and no apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast carcinoma cells *Cell Biol. Int.* 24. 253-260, (2000).
- 38.- Fisher, D E., Apoptosis en cancer therapy: crossing the threshold. *Cell.* 78: 539-542, (1994).
- 39.- Gorczyca, W., et al., Analysis of apoptosis by flow cytometry, *Methods in molecular biology*, Vol. 91, *Flow cytometry protocols*, Jaroszeski, M. J., et al., Ed. Humana Press, U:S.A., pp 217-238, (1998).
- 40.- Wyllie, A. H., Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endocuclease activation. *Nature.* 284: 555-556, (1980).
- 41.- Hideki, S., et al., Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 39: 96-99, (1998)
- 42.- Cardoso, M. A., et al., Differentiation, development and programmed cell death, *The Molecular basis of cell cycle and growth control*. Stein, G. S, et al., Ed. Wiley-Liss, pp 315-321, (1999).
- 43.- Wyllie, A. H.; Kerr, J F. R.; Currie, A. R., *Cell death: The Significance of apoptosis* *Int. Rev. Cytol.* 68: 255-281, (1980).
- 44.- Seamus, J. M. Et al., Protease activation during apoptosis: death by thousands cuts?. *Cell.* 82: 349-352, (1995).
- 45.- Jacobson, M D., et al , *Programmed cell death in animal development* *Cell.* 88: 347-354, (1997).
- 46.- Masato, E., et. al., A caspase- activated DNase that degrades DNA during the apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391: 43-50, (1998)
- 47.- Raff, M. C., Social controls on cell survival and cell death. *Nature (Lond.)* 356: 397-400, (1992).
- 48.- Isaacs, J. T., Role of programmed cell death carcinogénesis. *Envirom.Hlth. Perspect.* 101: 27-34, (1993)
- 49.- Schulze, K., et al., Cell nucleous and DNA fragmentation are not requeried for apoptosis. *J. Cell Biol* 127. 15-20, (1994).



- 50.- "American Type Culture Collection, Catalogue of Cell Lines & Hybridomas"  
Editores: Hay, R., Caputo, J., Chen, Macy, M., McClintock, P., Reid, E.U A, 7<sup>a</sup>  
Edición, pp 4, 122, 129, 194, 223 (1992).
- 51.- Correa, L, Quintero, A.; García, A. C., Cerbón, M. A., Caracterización  
molecular de líneas celulares de *cérvix* humano: Regulación de la expresión de  
p53 y Bcl-2 por estrógenos. Congreso Nacional. Asociación Mexicana de Biología  
Molecular en Medicina. Guanajuato, México. Octubre (1998)
- 52.- Scudiero, D. A , et al., Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for  
cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.  
Cancer Res. 48: 4827-4833, (1988)
- 53.- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for celular growth and survival  
application to proliferation and citotoxicity assay. J. Immunol. Meths 65: 55-63,  
(1983).
- 54.- Alley, M.C., et al , Feasibility of drug screening with panels of human tumor  
cells lines using a microculture tetrazolium assay Cancer Res. 48: 589-601,  
(1988)
- 55.- Carmichael, J, et al , Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated  
colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing Cancer Res. 47 936-  
942, (1987).
- 56.- Sargent, J. M., et al., Appraisal of the MTT assay as a rapid test of  
chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. Br. J. Cancer. 60: 206-210, (1989)
- 57.- Carmichael, J., et al., Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines  
using the MTT assay. Br. J Cancer. 57: 540-547, (1985).
- 58.- Wang, X.M., et al., Effects of 5-azacytidine and butyrate on differentiation and  
apoptosis of hepatic cancer cell lines. Annals of Surgery. 227: 922-931, (1998).
- 59.- Johnson, K. R., et al., Antagonistic interplay between antimitotic and G1-S  
arresting agents observed in experimental combination therapy. Clin. Cancer Res.  
5. 2559-2565, (1999).
- 60.-Giannakakou, P., et al., Low concentrations of paclitaxel induce cell type-  
dependent p53, p21 and G1/G2 arrest instead of mitotic arrest: molecular  
determinants of paclitaxel-induced citotoxicity. Oncogene. 20: pp 3806-3813, (2001)

61.- Baserga, R., et al , *Introduction to the cell cycle, The molecular basis of cell cycle and growth control.* Stein, G S., et al , Ed Wiley-Liss, pp 1-14, (1999)