



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA  
DE AMIDAS  $\alpha,\beta$ -INSATURADAS DERIVADAS DE  
FURANO EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NOEMÍ BARANDA AVILA



MÉXICO, D. F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Noemi Baranda Avila

FECHA: 26 de octubre del 2004

FIRMA: 

**Jurado asignado:**

Presidente	Prof. Angelina Quintero Ruiz.
Vocal	Prof. Rocío Pozas Horcasitas.
Secretario	Prof. Raquel Ortega Muñoz.
1er. Suplente	Prof. Marco Antonio Cerbon Cervantes.
2do. Suplente	Prof. Juan Gabriel Navarrete Vázquez.

**Sitio en 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:**



-----  
Noemi Baranda Avila.

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a los 2 seres más importantes en mi vida, mis padres, Teresita y Ubaldo, por el amor y la amistad que siempre me han brindado, por guiarme con mano firme y enseñarme a luchar siempre aspirando a lo más alto, pero sobre todo les agradezco que me hayan enseñado a ser una persona con decisiones firmes y alcanzar todos los sueños que me propongo.

A mi hermano Héctor quien en todo momento ha estado conmigo y quien me anima a superarme día con día.

A mis abuelos, José Encarnación<sup>+</sup> y Gloria<sup>+</sup>, por el amor y enseñanzas que dejaron una huella en mi vida y por que fueron mi inspiración para la realización de este trabajo, los amo.

## **AGRADECIMIENTOS:**

**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 la Dra. Angelina Quintero Ruiz**

Por su entrega y dedicación a la investigación y la enseñanza, por apoyarme en esta etapa de mi formación profesional y sobre todo por creer en mí.

**A la Dra. Rocío Pozas Horcasitas**

Por su amable e imprescindible contribución al facilitarnos los compuestos amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas del furano, base y origen de este trabajo.

**A la M.enC. Elizabeth Estrada Muñiz**

Por su amistad, comentarios y apoyo durante la realización de este trabajo.

**Al Q.F.B. José Dolores Solano Becerra**

Por su amistad y por asistirme en la realización de los experimentos.

**A los integrantes del jurado**

Por sus consejos, comentarios y sugerencias en la realización de este trabajo.

**A toda mi familia**

Pues ustedes son el pilar más importante en mi vida.

**A todos mis amigos**

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

Y en general a todas las personas con las que he convivido, gracias.

# ÍNDICE

## PÁGINA

1. Abreviaturas.....	6
2. Resumen.....	8
3. Objetivos.....	11
4. Hipótesis.....	12
5. Antecedentes teóricos	
5.1. Cáncer.....	13
5.1.1. Carcinogénesis química.....	15
5.1.2. La quimioterapia del cáncer.....	18
5.1.3. Mecanismo de acción de fármacos antineoplásicos.....	19
5.2. Ciclo celular y cáncer.....	23
5.3. Apoptosis.....	25
5.3.1. Cambios morfológicos y moleculares durante la apoptosis.....	26
5.4. Amidas $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano.....	27
5.5. Técnicas para medir viabilidad celular.....	33
5.5.1 Técnica del MTT.....	34
5.6. Citometría de flujo.....	35
6. Metodología	
6.1 Líneas celulares empleadas.....	37
6.2. Soluciones.....	38
6.3. Compuestos empleados.....	40
6.4. Citotoxicidad.....	41
6.5. Citometría de flujo.....	48
7. Resultados	
7.1. Resultados de citotoxicidad para las amidas $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano.....	50
7.2. Resultados de citometría de flujo para las amidas $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano...	62
8. Discusión.....	69
9. Conclusiones.....	77
10. Perspectivas.....	78
11. Referencias.....	79

## 1. ABREVIATURAS

Abs	absorbancia
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BLM	Bleomicina
°C	grados centígrados
c.b.p	cuanto basta para
CDK	ciclinas dependientes de cinasas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DDT	1,1,1-tricolor-2,2-bis-(p-clorofenil)etano
DES	dietilestilbestrol
D-MEM	Medio Tagle modificado de Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DS	Desviación estándar
EROS	Especies reactivas de oxígeno
g	gramos
G1	Fase del ciclo celular que se encuentra entre en el espacio en la división celular y la síntesis de ADN
G2	Fase del ciclo celular que se encuentra en el espacio entre entre la síntesis de ADN y la división celular
h	horas
HCL	ácido clorhídrico
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazin N'-(2-etanosulfónico )
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IC <sub>50</sub>	Concentración del compuesto que produce 50% de inhibición del crecimiento celular.
M	Fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células
MC	Muerte celular



MCP	Muerte celular programada
μg	microgramos
mg	miligramos
min	minutos
μL	microlitos
μM	micromolaridad
mL	mililitros
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
N	Normalidad
N <sub>2</sub> L	Nitrógeno líquido
NADH	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiamino Tetraacético
r.p.m	revoluciones por minuto
S	Fase del ciclo celular durante la que se realiza la síntesis de ADN
SOD	Superóxido dismutasa
%	por ciento

## 2. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad causada por diversos factores tanto físicos, químicos y biológicos que no ha mostrado una disminución en su incidencia en los últimos años<sup>27,59,67,80</sup>. Esta enfermedad resulta de la alteración genética de los oncogenes y de los genes supresores tumorales<sup>42,58,81,86,105</sup>, lo que conlleva a la transformación de las células normales a células autónomas que proliferan sin control y que pueden generar metástasis en otras partes del cuerpo si el proceso continúa<sup>2,15,101,104</sup>.

Los métodos no quirúrgicos con los que se cuenta para el tratamiento de este padecimiento son principalmente la radioterapia y la quimioterapia. La quimioterapia tiene como objetivo atacar selectivamente al proceso metabólico implicado en la condición patológica<sup>39</sup>, sin embargo existen algunas barreras para el tratamiento, tales como la heterogeneidad biológica y la resistencia de muchas células a los agentes convencionales contra el cáncer, por lo anterior la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral es de gran relevancia<sup>39,56</sup>.

Se sabe que el nifurtimox, compuesto derivado del nitrofurano, induce un incremento en la velocidad respiratoria y una liberación de  $H_2O_2$ , por lo que el mecanismo mediante el cual actúa es generando estrés oxidativo razón por la cual este compuesto fue utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero la venta de nifurtimox fue descontinuada ya que no produjo las ganancias esperadas además de ser tóxico para el hospedero, por lo que fue retirado del mercado<sup>13,23,24,61,68</sup>.

Dentro de las estrategias para la cura del cáncer se encuentra la búsqueda de compuestos tóxicos por lo que, aprovechando las propiedades de los derivados de este tipo de compuestos, a partir del año 2001 el grupo de investigación de la Dra. Pozas Horcasitas<sup>13,24,89</sup> sintetizó, una serie de amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano utilizando como molécula líder al nifurtimox.

En el presente trabajo se determinó la actividad citotóxica de 9 compuestos de esta serie en las líneas celulares CaLo, C-33, HeLa, de cáncer de cérvix humano, K-562, de leucemia MCF-7, de cáncer de mama humano y SW480, de cáncer colorrectal humano.

De las 9 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano 7 presentaron actividad citotóxica en la mayoría de las líneas celulares tumorales. En términos generales se observó que las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano que tienen un grupo  $\text{NO}_2$  en R1 y en R2 un anillo aromático con sustituyentes electroattractores resultaron tener mayor actividad citotóxica. Los compuestos 1 y 2 son los más activos, ya que presentan una  $\text{IC}_{50}$  más pequeña, en un intervalo de 5 – 31  $\mu\text{M}$  para el (2*E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) donde la  $\text{IC}_{50}$  para la línea celular K-562 resultó ser de  $5.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$  y entre 3 – 20.2  $\mu\text{M}$  para el (2*E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) donde la  $\text{IC}_{50}$  para la línea celular C-33 resultó ser de  $3.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ .

Basados en el hecho de que diversos fármacos anticancerígenos inducen arresto del ciclo celular<sup>31,50,54,72,82</sup>, se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo con el objeto de determinar si los compuestos (2*E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide)

(compuesto 1) y el (2*E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) inducen efectos sobre la distribución del ciclo celular, encontrándose que ambos compuestos inducen un arresto transitorio en la fase S a las 24 y 48h, así como la aparición de una población celular con un contenido de ADN menor a 2n previo a la población de G0/G1 a las 24, 48 y 72h de tratamiento, lo cual es sugerente de una muerte por apoptosis<sup>3,7,37</sup>.

### 3. OBJETIVOS

Objetivo general.

- Evaluar el efecto citotóxico de nuevos compuestos amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivados del furano en diversas líneas celulares tumorales humanas.

Objetivos particulares.

- Determinar la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano.
- Evaluar el efecto de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano sobre la distribución del ciclo celular.

#### **4. HIPÓTESIS**

- Se ha demostrado que compuestos derivados del furano presentan actividad citotóxica por lo tanto se espera que las nuevas amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano también presenten actividad citotóxica.

## 5. ANTECEDENTES TEÓRICOS

### 5.1 CÁNCER

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos, de estos casi la mitad pertenecen a países en desarrollo y aproximadamente 5 millones de personas mueren anualmente<sup>22,79</sup>. En México, el cáncer es una de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad en la población (13%) registrándose para el año 2001 alrededor de 54 843 defunciones nacionales por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI)<sup>22</sup>, siendo los órganos más afectados: pulmón, útero, cérvix, mama, colón y prostata<sup>79</sup>.

Aunque con frecuencia se considera como una sola enfermedad, el cáncer es realmente una serie compleja de enfermedades que afectan a un amplio rango de células y tejidos. La primera conexión entre cáncer y la genética se propuso a principios del siglo XX<sup>55,86</sup>, y esta idea ha servido como una de las bases en la investigación sobre esta enfermedad. En la actualidad se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de varios genes<sup>44,86,94</sup>. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, entre otros procesos, y la pérdida o inactivación de estos genes da lugar a una división celular descontrolada que conducen a la formación de tumores<sup>42,44,55,86,94</sup>. Los factores ambientales y los virus juegan también un papel importante en las alteraciones genéticas que son necesarias para transformar células normales en cancerosas, por lo que el mejor modelo para explicar el origen de esta enfermedad es el multifactorial<sup>27,59,67,80,105</sup>.

El paso inicial para que una célula normal pueda generar cáncer es la alteración de un gen, que participa en la regulación del ciclo celular, por medio de mutaciones, aumento o disminución en la expresión o por fallas en el metabolismo del ADN<sup>27,81</sup>. Aunque se sabe que la adquisición de una mutación es un paso inicial importante, no es suficiente para generar la enfermedad, pues esta es un proceso molecular y celular dependiente del tiempo y de otras mutaciones por lo que pueden pasar varios años antes de que las células expresen modificaciones fenotípicas<sup>86,105</sup>, excepto para el caso del cáncer causado por virus altamente oncogénicos<sup>25,30,80</sup>.

Debido a que las células cancerosas pierden la capacidad para regular su propio crecimiento y división, pueden desarrollarse dando lugar a tumores malignos. Para que un tumor crezca necesita librar ciertas barreras como, limitación por el tejido adyacente, reducción de la cantidad de nutrientes, factores de crecimiento y oxígeno. La falta de oxígeno, genera un estado de hipoxia, lo que favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso llamado angiogénesis, el cual puede ser un indicador del potencial invasivo de las células tumorales a tejidos vecinos<sup>15,101,104</sup>.

Para que ocurra la diseminación y establecimiento de las células tumorales desde su sitio de origen a otro, estas tienen que separarse del tumor primario y entrar en el sistema circulatorio sanguíneo o linfático con el fin de transportarse. Para alcanzar una nueva localización, las células tumorales pasan a través de la capa de células epiteliales que revisten el interior de la pared del capilar (o vaso linfático) y penetran en la matriz extracelular adyacente, aquí las células metastásicas segregan enzimas (metaloproteinasas)



que digieren las proteínas de los cimientos membranosos, creando agujeros a través de los cuales se pueden desplazar y entrar en un nuevo tejido para establecer el tumor secundario. Este proceso, llamado metástasis, es a menudo la principal causa de muerte en los pacientes con cáncer<sup>2,15,101,104</sup>.

### 5.1.1. CARCINOGENESIS QUÍMICA

Las sustancias químicas que pueden causar cáncer son llamadas carcinógenos químicos, y son divididos en dos clases: genotóxicos y no genotóxicos<sup>35,60,10</sup>.

#### Carcinogénesis química genotóxica.

Los carcinógenos químicos genotóxicos son compuestos biológicamente activos debido a su estructura química, estos son usualmente agentes electrofilicos que interactúan directamente y específicamente con macromoléculas celulares (ADN)<sup>35,10</sup>, debido a esto son capaces de causar mutaciones en los genes supresores tumorales y los proto-oncogenes<sup>60,10</sup>.

Es conocido que la carcinogénesis química ocurre en varias etapas: la iniciación, la promoción y la progresión<sup>35,10</sup>.

La iniciación de la transformación maligna de una célula normal por un agente carcinógeno, se refiere al daño que ejerce este al interactuar con el ADN, o por eventos epigenéticos que modulan la expresión génica sin que reaccione directamente con las bases del ADN. Si la alteración en el ADN no se corrige esta etapa es irreversible y se dice que la célula se ha iniciado<sup>10,35,60</sup>.

Después de que la célula sufre un cambio genotípico y fenotípico debido a un daño en el ADN, comienza la promoción en donde se da una expansión clonal de las células iniciadas bajo la influencia de promotores; tales como ésteres de forbol, fenobarbital, pentaclorofenol, sacarina, sustancias que no generan genotoxicidad por sí mismas, sin embargo actúan como mitógenos para el tipo celular transformado<sup>35</sup>. Este proceso a diferencia de la iniciación es reversible si el agente promotor se deja de producir o administrar<sup>10</sup>.

La fase de progresión es la transición de las células iniciadas hasta el fenotipo maligno, lo cual sucede por efecto de la promoción y la inestabilidad genómica de las células. Este proceso puede durar varios años en el humano y conduce al desarrollo de una heterogeneidad celular dentro de un tumor<sup>10,32,35</sup>. La evolución del proceso neoplásico se representa en la figura 1.

Carcinogénesis química no genotóxica.

Los carcinógenos no genotóxicos son un grupo de sustancias químicas como la ciclosporina, el 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil)etano (DDT), el dietilestilbestrol (DES), etc; los cuales inducen la formación de tumores por vías que difieren de la interacción directa con el ADN<sup>32,58,61</sup>. Dichos mecanismos incluyen inmunosupresión, desbalances hormonales, interferencia con los mecanismos de señalización para la transducción y la expresión de genes que están involucrados en la regulación del crecimiento y diferenciación celular, provocando que las células respondan a señales proliferativas por más tiempo del que lo hacen normalmente<sup>32,33,60,10</sup>. En 1993, Swenberg determinó que este aumento en la

proliferación de las células causado por los carcinógenos no genotóxicos esta relacionado con la inducción del cáncer<sup>34</sup>.

Otros mecanismos mediante los cuales actúan los carcinógenos no genotóxicos son la generación de sustancias oxidantes o aumento en la activación metabólica de carcinógenos químicos, así como por acción cocarcinogénica<sup>32,33,81</sup>. Un cocarcinógeno es un agente que administrado de manera conjunta o antes de un carcinógeno, incrementa la formación de tumores, como el dióxido de silicio que en combinación con benzo[ $\alpha$ ]pireno, presentan un comportamiento de cocarcinógeno para la formación de tumores de la laringe, traquea y pulmones en animales de experimentación<sup>10,81</sup>. Un comportamiento similar lo presentan los polvos de asbestos y el hábito de fumar<sup>10,33</sup>.

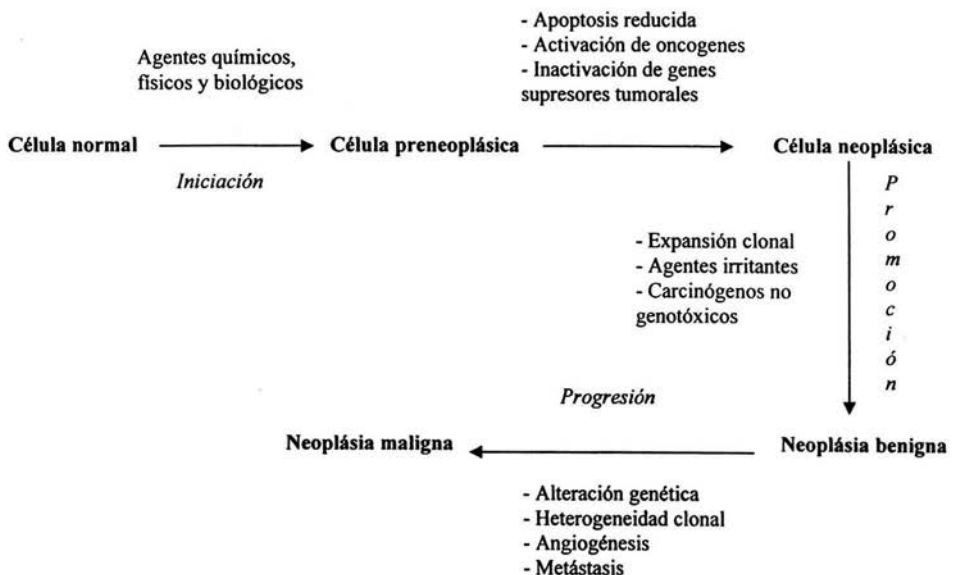


Figura 1.- El proceso neoplásico es multietapas, multifactorial y al azar. Una célula normal puede convertirse en neoplásica por su interacción con agentes físicos, biológicos o químicos, lo cual inicia a la célula y le confiere una mayor probabilidad de malignización. Al promoverse la división celular la célula iniciada forma un foco neoplásico benigno, el cual puede progresar hasta un fenotipo maligno esta promoción no es controlada por las células tumorales y cualquier ventaja fenotípica es un proceso totalmente aleatorio.

### 5.1.2. LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

El cáncer es considerado como una enfermedad prevenible en la medida en que sus causas y factores de riesgo conocidos puedan evitarse. Se estima que de 30 a 40% de los cánceres anuales en el mundo pueden evitarse reduciendo el consumo de tabaco, propiciando cambios en los hábitos alimenticios y en la actividad física al mismo tiempo que se mantenga un peso corporal adecuado<sup>59</sup>.

Muchos de los cánceres son curables a través de la aplicación de los tratamientos adecuados que combinan cirugía, radioterapia y quimioterapia, los cuales han permitido mejorar de manera sustancial la calidad de vida de los pacientes, disminuyendo y abatiendo la mortalidad<sup>59</sup>.

Aunque la cirugía continúa siendo la principal arma terapéutica, actualmente se ha logrado que esta sea menos agresiva, lo cual se debe en gran medida al empleo de la radioterapia, la cual puede eliminar o disminuir la masa tumoral con gran precisión. No obstante, esa forma de terapia es local y solo tiene efecto si las células malignas se encuentran localizadas dentro del campo irradiado, por lo tanto es ineficaz para combatir la metástasis<sup>48,36a,59</sup>.

La quimioterapia, que es la tercera arma con la que se cuenta para combatir los diversos tipos de cáncer, puede ser curativa o paliativa, teniendo como objetivo, atacar las diferencias bioquímicas existentes entre el proceso neoplásico y las células normales con el fin de interferir lo más selectivamente con la enfermedad<sup>43,48</sup>.

La mayoría de los fármacos citotóxicos actúan sobre células en proliferación, por lo que se formuló la hipótesis de que los tumores con alta división celular son más susceptibles al

tratamiento, al igual que los tejidos con alto recambio como la piel, medula ósea, folículos pilosos y epitelio<sup>5,12,24</sup>. Sin embargo esto no es aplicable para todos los casos, ya que algunos tumores de alta proliferación son insensibles al tratamiento y algunos de lento crecimiento son sensibles a este<sup>36a, 19</sup>.

En un principio se pensó que la forma en la que los fármacos citotóxicos disminuían el tamaño del tumor era por necrosis, no obstante, actualmente se sabe que es la muerte celular programada el mecanismo por el cual las células tumorales mueren, aunque algunos fármacos inducen necrosis a concentraciones elevadas y apoptosis a concentraciones bajas<sup>34,57</sup>.

Algunos de estos fármacos como el paclitaxel, vinblastina, vincristina metotrexate, hidroxiurea, actúan sobre una fase específica del ciclo celular, sin embargo, existen otros como los agentes alquilantes, análogos y antagonistas hormonales que no son específicos de alguna fase ya que causan daño inespecífico al ADN o a que inhiben la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación<sup>36ayb, 41</sup>.

### 5.1.3 MECANISMOS DE ACCIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

- a) Agentes alquilantes: La quimioterapia contra el cáncer nació al estudiar las acciones biológicas y químicas de las mostazas nitrogenadas, las cuales reaccionan sobre los grupos nucleofílicos del ADN, principalmente en el átomo de nitrógeno 7 de la guanina lo que permite la formación de pares de

bases anómalas con timina; los agentes alquilantes bifuncionales causan una unión de tipo covalente entre las dos cadenas de ADN. Entre los efectos farmacológicos más importantes que presentan estos agentes son la alteración de mecanismos que intervienen en la proliferación celular, en particular la síntesis de ADN y la división celular. Aunque estos fármacos no actúan sobre una fase específica del ciclo celular, se observa mayor sensibilidad al final de la fase G1 y en la fase S. Ejemplos de este tipo de fármacos son la mecloretamina, bisulfán y clorambucil<sup>36ayb,41</sup>.

- b) Antimetabolitos: Estos compuestos interfieren con la producción de ácidos nucleicos, ya que pueden inhibir la producción de desoxirribonucleosidos trifosfatos, precursor inmediato de la síntesis del ADN, dando como resultado la inhibición del proceso de replicación, otro mecanismo por el cual pueden prevenir la síntesis de nucleósidos trifosfatos, es debido a que algunos antimetabolitos poseen una estructura similar a las purinas o pirimidinas por lo que pueden sustituir a estos nucleósidos en la rutas anabólicas de los nucleótidos. Los derivados nucleótidos de estos antimetabolitos no solo inhiben la formación de precursores normales si no que pueden ser utilizados como sustratos y ser incorporados dentro del ARN o ADN con el propósito de generar citotoxicidad. En este grupo se incluyen los antagonistas de folato, de aminoácidos, de purinas y pirimidinas los cuales actúan en la fase S del ciclo celular. Ejemplo de antagonistas del folato es el metotrexato, de las pirimidinas el 5-fluorouracilo, de las purinas la 6-mercaptopurina y de los aminoácidos la azaserina<sup>36a y b,41</sup>.

- c) Inhibidores de las topoisomerasas I y II: Estos agentes estabilizan la unión de un complejo de topoisomerasa I ó II con el ADN causando rupturas de una o de las dos hebras dependiendo de la enzima que se trate. Estos inhibidores actúan en las fases S y G2. Ejemplos de los inhibidores de la topoisomerasa I son la captotecina y el topecan, para la topoisomerasa II el etoposido y el tenoposido<sup>41</sup>.
- d) Antibióticos antitumorales: Proviene de la bacteria del género *Streptomyces* y presentan la característica de intercalarse entre las bases nitrogenadas de ADN de forma horizontal debido a fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, esto causa la inhibición de la síntesis de RNA y ADN además algunos presentan la propiedad de formar radicales libres de oxígeno que originan la ruptura de las cadenas de ADN. Ejemplos de este tipo de fármacos son la actinomicina D, la daunorrubicina y las bleomicinas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub><sup>41</sup>.
- e) Inhibidores de la mitosis : Se incluyen en este grupo los alcaloides de la vinca tales como vinblastina y vincristina, así como el taxol, estos productos se unen específicamente a los dímeros  $\alpha$ ,  $\beta$  de la tubulina que forman los microtúbulos del aparato mitótico, provocando una detención de la división celular en metafase<sup>36ayb,41</sup>.

El mecanismo sobre la tubulina se puede clasificar en dos tipos. Los agentes despolimerizantes tales como vinblastina y vincristina y agentes polimerizantes como es el caso del paclitaxel, el cual posee efectos farmacológicos peculiares como inhibidor de la mitosis. Los efectos celulares del paclitaxel son dependientes de la dosis y tiempo de tratamiento y son: inhibición de la proliferación, centrosomas mitóticos con arreglos de microtúbulos no asociados con el centrosoma, incremento en la concentración de tubulina posiblemente por la inducción de la expresión de esta, resistencia a la despolimerización y apoptosis. El paclitaxel causa que los microtúbulos no sean funcionales y sostiene un bloqueo entre la vecindad de las fases metafase y anafase de la mitosis<sup>36a,41</sup>.

- f) Agentes hormonales: Se sabe que el crecimiento de tumores primarios y secundarios en órganos sexuales como ovarios, mamá y próstata, son dependientes de hormonas estrogénicas y/o androgénicas, debido a que los carcinomas de estos órganos exhiben requerimientos hormonales para que estos puedan seguir creciendo; por lo que la inhibición de la biosíntesis de hormonas ofrece un método como tratamiento para este tipo de tumores. Existen diferentes mecanismos para llevar a cabo lo anterior como la administración de agonistas de hormona liberadora de gonadotropina, con antiandrógenos, o compuestos que actúan como inhibidores competitivos de la unión del estradiol a receptores de estrógenos lo cual induce un cambio en el receptor al unirse al elemento reactivo del estrógeno en ADN. Ejemplo de este tipo de fármacos son el tamoxifen y la nafodixina<sup>36b,41</sup>.



## 5.2. CICLO CELULAR Y CÁNCER

La capacidad de una célula para reproducirse es quizás la propiedad fundamental de la vida. Para que un organismo pueda crecer, tres eventos deben de ocurrir: la masa celular debe aumentar, el material genético debe ser duplicado y el proceso de división debe ocurrir, asegurando que cada célula hija reciba un complemento genético igual e idéntico para asegurar la perpetuación de la estirpe celular<sup>17,21,94</sup>. En los organismos, la ocurrencia de estos eventos de manera ordenada y progresiva constituyen el ciclo celular<sup>17,44,94</sup>

Resumiendo lo esencial, el ciclo celular progresa desde la fase G1 período que sigue a una división celular y es previo a la síntesis o replicación del ADN. Durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos sus componentes como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular. Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo, en lo que se ha denominado fase G0<sup>21,44,94</sup>. La fase S (de "Síntesis" del ADN) corresponde al tiempo (6-8 h) durante el cual se replica el ADN. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble, que son copia una de la otra<sup>44,94</sup>. El período comprendido entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la división es la fase G2.

En la fase G2 las células se preparan para la escisión en dos células hijas durante la mitosis. La mitosis es un proceso continuo de eventos nucleares y citoplásmicos, que incluye cinco fases: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis<sup>17,25,42,99</sup>.

Existen de manera general tres puntos de control durante el ciclo celular: uno se encuentra al final de G1 en el que la célula comprueba que ha generado la masa celular necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN y, también, que las condiciones ambientales son favorables como son la presencia de nutrientes, sales y temperatura adecuada; y de factores que induzcan crecimiento<sup>21,25,94</sup>; otro punto de control se encuentra al final de G2, antes de entrar a mitosis en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas, y que ha completado la replicación del ADN<sup>44,94</sup>. El último punto de control se encuentra entre la transición metafase-anafase y aquí se checa el correcto alineamiento de los cromosomas en el plano ecuatorial antes de producirse la segregación de las cromátidas hermanas. Las moléculas centrales de la regulación del ciclo celular, entre otras, son los complejos ciclina-CDK ( cinasas dependientes de ciclinas) las cuales controlan el avance del ciclo<sup>25,94</sup>.

Se sabe que las células cancerosas pierden el control sobre el ciclo celular y proliferan rápidamente, debido a esto en los últimos años las investigaciones sobre el control genético del ciclo celular han sido de gran importancia para el estudio de la biología del cáncer, por lo que se han identificado y caracterizado genes implicados en su regulación, los cuales pueden actuar normalmente deteniendo la división celular o aquellos genes que normalmente funcionan promoviendo la división celular<sup>42,44,86,94</sup>. La primera clase, llamados genes supresores de tumores, regulan el ciclo celular de forma negativa inhibiendo la división celular. Si estos genes quedan completamente inactivados o se pierden por mutación, se pierde el control sobre la división celular y la célula comienza a proliferar de un modo incontrolado<sup>21,42,44</sup>.

Los genes que regulan de forma positiva el ciclo celular son los llamados protooncogenes, que funcionan normalmente promoviendo la división celular. Los protooncogenes se denominan oncogenes cuando se encuentran alterados y estos inducen o mantienen una proliferación celular incontrolada asociada con el cáncer<sup>42,44</sup>.

### 5.3. APOPTOSIS

Los animales multicelulares necesitan eliminar células que están en exceso o que son potencialmente peligrosas; para llevar a cabo esto, las células utilizan un programa molecular exclusivo para este fin. Tan importante como la división celular y la migración celular, la muerte celular programada (MCP), que ocurre bajo condiciones fisiológicas, permite al organismo mantener la homeostasis controlando el número de células y el tamaño de los tejidos<sup>35,76</sup>.

El hecho de que la MCP esté bajo el control de un programa genético específico, implica que la célula tiene una participación activa en su destrucción. No fue hasta 1972 que Willie y Kerr formalizaron la existencia de una MCP a la cual le acuñaron el término de “apoptosis” ( del griego arcaico apo-TEO-sis, que se refiere a la “caída natural de las hojas en otoño”)<sup>9,25,35</sup>, esta difiere de la necrosis, también llamada muerte celular patológica o accidental, ya que este proceso de muerte surge cuando una célula presenta un daño severo y pierde entre otras cosas la integridad de su membrana que la lleva a su muerte por lisis<sup>43,76,105</sup>.

Apoptosis es usado frecuentemente como sinónimo de MCP, sin embargo poseen significados diferentes. MCP, se refiere al proceso de decisión que lleva a la

autodestrucción de la célula, mientras que muerte por apoptosis es un término descriptivo que se refiere a los procesos bioquímicos y cambios morfológicos que ocurren durante la muerte celular que resultan de la activación del programa de muerte<sup>3,35,75,87</sup>.

En procesos biológicos como la metamorfosis, morfogénesis embrionaria, mantenimiento de homeostasis de órganos y tejidos, desarrollo normal de los vertebrados y remoción de células autoinmunes, dañadas o viejas<sup>3,4,29,35,42,87</sup>, la apoptosis juega un papel crucial; sin embargo alteraciones en esta se han relacionado en condiciones patológicas, daños neurológicos secundarios a enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y cáncer<sup>4,74,75</sup>; en esta última, la desregulación de la apoptosis es un mecanismo fundamental para su desarrollo, participando desde las etapas iniciales de la carcinogénesis (transición de lesiones preneoplásicas a invasoras), en el fenómeno metastático y por supuesto en la respuesta a los tratamientos antineoplásicos, llámese radioterapia o quimioterapia<sup>3,4,74,75</sup>.

### 5.3.1. CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES DURANTE LA APOPTOSIS.

Los procesos morfológicos y moleculares que ocurren durante la muerte por apoptosis, son claramente diferentes de los que acompañan a la muerte por necrosis. Las diferencias fundamentales entre estos dos tipos de MC se resumen en la tabla 1.

Tabla 1.- Diferencias morfológicas y moleculares entre apoptosis y necrosis<sup>3, 42, 43, 74, 75, 84,85</sup>

Característica	Apoptosis	Necrosis
Participación celular	Activa, controlada por un programa genético	Pasiva, carente de control genético
Volumen celular	Se reduce	Aumenta
Cromatina nuclear	Condensación compacta (piknosis), con marginación nuclear	Condensación laxa y localización difusa
Núcleo	Fragmentado (karyorrhexis)	Fragmentado
ADN	Fragmentación internucleosomal, patrón de escalera	Fragmentación irregular, patrón de barrido
Orgánulos	Permanecen íntegros y no se fusionan con lisosomas.	Se hinchan y tienden a fusionarse con lisosomas
Membrana celular	Translocación de fosfatidilserina de la capa interna de la membrana hacia la capa externa.	Conserva asimetría de fosfolípidos y se pierde la integridad
Citoesqueleto	Conserva estructura	Se desorganiza
Citoplasma	Se conserva de los cuerpos apoptóticos	Se vierte al espacio intersticial
Activación de proteasas	Familia de las caspasas	Inespecífica y asociada a disfunción lisosomal
Estrés oxidativo	Presente desde etapas tempranas	Presente sólo en etapas tardías
Catabolismo lipídico	Producción de ceramida y metabolitos derivados.	Activación inespecífica de fosfolipasas.
Reacción inflamatoria	Ausente	Presente
Cicatrización	Ausente	Presente, a menudo con fibrosis

#### 5.4. AMIDAS $\alpha,\beta$ -INSATURADAS DERIVADAS DE FURANO.

En 1976, Docampo R. Y Stoppani A. proponen que el Nifurtimox (Figura 2), compuesto derivado del nitrofurano, induce un incremento en la velocidad respiratoria y una liberación de  $H_2O_2$  en las células por medio del siguiente mecanismo de acción (Figura 3)<sup>23,13,24,61,68</sup>.

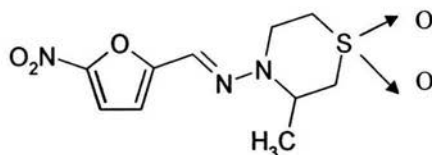


Figura 2.- Estructura química del nifurtimox.

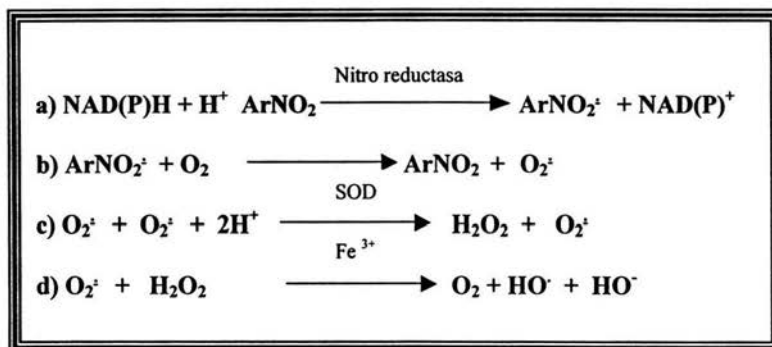


Figura 3.- Mecanismo de acción del Nifurtimox, en el que se observa la generación de derivados tóxicos de oxígeno.

La primera reacción (a) que se presenta en este mecanismo, es la reducción del grupo nitro de los nitrofuranos por NADPH como donador de electrones en presencia de nitroreductasa formando, como primer producto, el anión radical nitrofurano  $\text{ArNO}_2^{\cdot -}$ <sup>13,24,89</sup>.

Bajo condiciones aeróbicas (b), el ión radical nitrofurano se oxida rápidamente por medio de oxígeno molecular para formar el anión radical superóxido  $\text{O}_2^{\cdot -}$ . En la reacción (c) se ilustra la producción de peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a partir de dos aniones radical

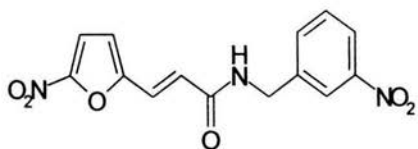
superóxido en presencia de protones y superóxido dismutasa (SOD). A través de la reacción de un anión radical superóxido  $O_2^-$  con peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  catalizada con  $Fe^{3+}$  (d) se produce el radical libre hidroxilo, especie reactiva sumamente tóxica<sup>13,23</sup>.

El mecanismo mediante el cual actúa el Nifurtimox es generando estrés oxidativo, el cual se refiere a la generación incrementada de  $O_2^-$  (anión superóxido) y  $H_2O_2$ , razón por la que este compuesto fue utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pero la venta de Nifurtimox, único medicamento usado para esta parasitosis, fue discontinuada ya que no produjo las ganancias esperadas además de ser tóxico para el hospedero, por lo que fue retirado del mercado<sup>1,13,23</sup>.

Dentro de las estrategias para la cura del cáncer se encuentra la búsqueda de compuestos tóxicos, por lo que, aprovechando las propiedades de los derivados de este tipo de compuestos, a partir del año 2001 el grupo de investigación de la Dra. Pozas Horcasitas<sup>13,24,89</sup> sintetizó, una serie de amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano utilizando como molécula líder al nifurtimox.

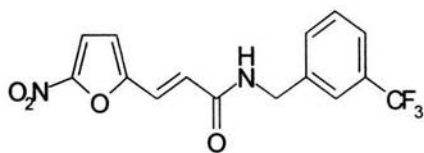
De esta serie son 9 los compuestos (Figura 4) utilizados durante este trabajo experimental con la finalidad de determinar su posible potencial como agentes quimioterapéuticos.

1)



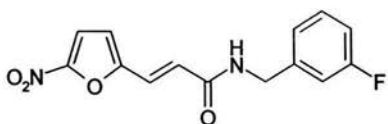
(2E)-N-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

2)



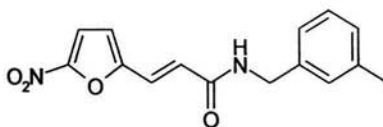
(2E)-3-(5-nitro-2-furyl)-N-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide

3)



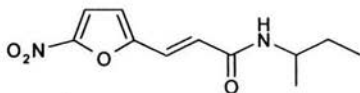
(2E)-N-(3-fluorobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

4)



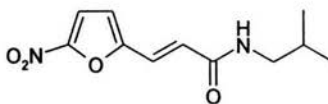
(2E)-N-(3-methylbenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

5)



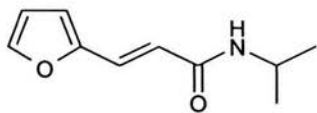
(2E)-N-(secbutyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

6)



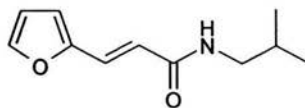
(2E)-N-isobutyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide

7)



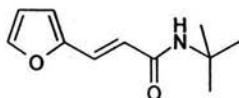
(2E)-3-(2-furyl)-N-isopropylacrylamide

8)



(2E)-3-(2-furyl)-N-isobutylacrylamide

9)



(2E)-N-(tert-butyl)-3-(2-furyl)acrylamide

Figura 4.- Estructuras de las 9 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas de furano.



El mecanismo mediante el cual actúa la molécula líder, nifurtimox, es generando estrés oxidativo. Se sabe que cuando se genera estrés oxidativo, con una excesiva producción de EROS( especies reactivas de oxígeno), se provoca una muerte de tipo necrótica en la célula como resultado de un daño celular masivo asociado con peroxidación de lípidos y alteraciones de proteínas y ácidos nucleicos<sup>20,51,52,65</sup>. Para prevenir el daño oxidativo las células poseen un complejo sistema de defensa antioxidante, por lo que las células están bajo un continuo “estado oxidativo” y su supervivencia depende del balance entre EROS y antioxidantes<sup>26,39,53</sup>.

Sin embargo, la posible implicación de EROS como moléculas de señalización en muertes más fisiológicas como MCP es un concepto reciente. Diversas observaciones que sugieren lo anterior son: 1) la adición de EROS o la disminución de antioxidantes pueden generar muerte celular, 2) MCP , puede ser retrasada o inhibida por antioxidantes, 3) El incremento intracelular de EROS esta asociado con MCP<sup>12,64,92</sup>.

La MCP mediada por EROS es producida por la mitocondria, ya que estos modifican la permeabilidad de la membrana permitiendo la liberación de factores pro-apoptóticos<sup>51,39</sup>.

Algunos factores que generan estrés oxidativo en los seres humanos son: vida sedentaria, ejercicio físico exhaustivo, muerte celular, dietas pobres en antioxidantes, humo de cigarro, fármacos anticancerígenos, etc<sup>20,65,77</sup>.

Recientemente la inducción de estrés oxidativo ha sido empleada en el tratamiento del cáncer como es la inyección intratumoral de la enzima glucosa oxidasa, la cual produce

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dentro de tumores sólidos, lo que retarda el crecimiento del mismo, similarmente el sistema hipoxantina / xantina oxidasa ha sido empleado en el tratamiento de carcinomas de células escamosas en conejos encontrando resultados similares<sup>20</sup>, no obstante estos se encuentran en etapas tempranas de estudio y necesitan una mayor exploración antes de que puedan ser usados en el tratamiento de cánceres humanos, sin embargo la radiación ionizante y diversos quimioterapéuticos por ejemplo la bleomicina ejercen su citotoxicidad a través de EROS<sup>12, 36ayb,34</sup>.

En 1966 Umezawa y colaboradores descubrieron un grupo importante de agentes antineoplásicos, obtenidos como producto de fermentación de *Streptomyces verticillus*, las bleomicinas (BLM), las cuales han despertado un gran interés por su notable actividad antitumoral contra carcinomas escamosos de cabeza, cuello y pulmones, linfomas y tumores testiculares, y por su novedosa capacidad de desdoblarse ADN<sup>36ayb,41</sup>.

Las BLM son glucopéptidos básicos hidrosolubles, los cuales causan degradación de ADN al interactuar con oxígeno y fierro. En presencia de oxígeno y un agente reductor, el complejo metal-fármaco se activa y actúa mecánicamente en la forma de ferroxidasa, y de este modo transfiere electrones del hierro al oxígeno molecular para producir especies activadas de oxígeno. Las BLM se ligan al ADN a través de su péptido amino terminal y el complejo activado genera radicales libres que se encargan de la degradación del ADN<sup>36ayb,41</sup>.

## 5.5. TÉCNICAS PARA MEDIR VIABILIDAD CELULAR

Los métodos para medir viabilidad celular son diversos; algunos se basan en la integridad de la membrana por exclusión o captura de colorantes (exclusión de azul de tripano, eritrosina; captura de diacetilfluoresceína) o por captura y retención de iones radioactivos ( $^{51}\text{Cr}^{3+}$ )<sup>14, 40</sup>.

Sin embargo, los ensayos que se utilizan para medir la viabilidad de células después de su exposición a un compuesto citotóxico no pueden estar completamente basados en la integridad de la membrana, debido a que estos ensayos se realizan a tiempos donde las células muertas podrían haber desaparecido a causa de una ruptura<sup>14,40</sup>. En su lugar se utilizan ensayos indirectos que miden la capacidad de la célula para seguir realizando síntesis de ADN ( que se puede medir utilizando timidina-<sup>3</sup>H), de proteínas ( por el método colorimétrico de sulforrodamina B, utilizando aminoácidos radioactivos) , la capacidad de realizar respiración aeróbica (ensayo del MTT), la capacidad de la célula de seguir proliferando después del tratamiento (ensayo clonogénico)<sup>40,91</sup>.

Estos ensayos *in vitro* presentan limitaciones debido a que la toxicidad que se mide es solo un evento celular además de ser sobreestimada en ocasiones y solo pueden ser extrapolados con precaución a situaciones *in vivo*<sup>14</sup>.

### 5.5.1 TÉCNICA DEL MTT

La técnica del MTT, descrita por Mossman en 1983, es una de las más utilizadas y provee una forma rápida y fácil de medir viabilidad celular después de un tiempo de exposición a un compuesto con posible actividad citotóxica y se basa en la capacidad de las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Figura 5), soluble en agua y de color amarillo, a un compuesto insoluble en agua y de color púrpura (formazán del MTT) (Figura 6) de este modo la reducción del MTT es directamente proporcional a la cantidad de células viables<sup>14,40,69,91</sup>.

Utilizando homogeneizados de hígado de rata se descubrió que la reducción del MTT se lleva a cabo en la cadena respiratoria a nivel de la ubiquinona en conjunto con los citocromos b y c; lo cual ocurre en la mitocondria; sin embargo no es este el único sitio donde se efectúa la reducción del MTT, puesto que este compuesto también acepta electrones de substratos reducidos y coenzimas tales como el NADH y NADPH<sup>14,69</sup>.

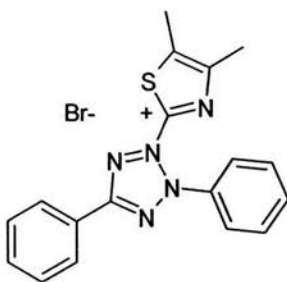


Figura 5.- Estructura química del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-4-4)-2,5-difeniltetrazolio.

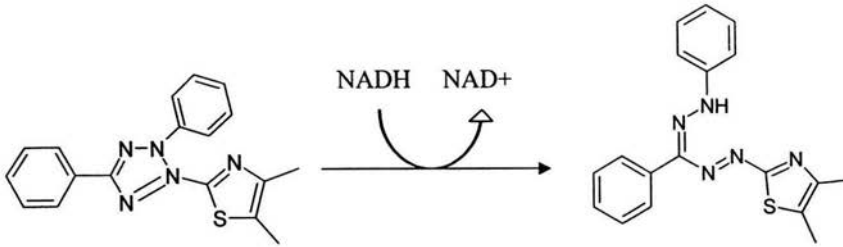


Figura 6.- Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo tetrazolio el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria

## 5.6. CITOMETRIA DE FLUJO.

La técnica de citometría de flujo fue desarrollada en la década de los años sesenta en los Estados Unidos y Alemania con la intención de representar un avance en el proceso de contar y medir el tamaño de partículas o células en poblaciones no homogéneas<sup>37,82</sup>.

El estudio del contenido de ADN y fases del ciclo celular por citometría de flujo ha sido una de las primeras y más empleadas aplicaciones de la citometría de flujo<sup>21,31,82</sup>.

Las células malignas, en algunos tumores humanos, poseen frecuentemente alteraciones en el contenido del ADN que pueden detectarse por citometría de flujo; por otro lado se sabe que la mayoría de los fármacos anticancerígenos o compuestos con posible actividad antitumoral inducen arresto del ciclo celular por lo que esta técnica es una herramienta para determinar como actúan<sup>37,82</sup>.

Los fluorocromos que se usan para la cuantificación de ADN por citometría de flujo se clasifican en función de su mecanismo de unión. Los intercalantes como el bromuro de etidio, yoduro de propidio y naranja de acridina que se unen al material genético de doble cadena intercalándose entre dos bases; los de unión preferente a las bases de adenina-timina, como, DAPI y Hoescht y; por último, los de unión preferente a las bases de citosina-guanina, como la mitramicina, olivomicina y cromomicina A<sub>3</sub><sup>21,31,82</sup>.

Las ventajas que proporciona esta técnica experimental es una elevada sensibilidad, velocidad de análisis y la posibilidad de realizar mediciones simultáneas sobre una sola célula etc<sup>21,31,82,94</sup>.

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.

CALO: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, fueron aisladas de una paciente mexicana y posee la información del virus del papiloma humano 18<sup>6</sup>.

C-33: Línea proveniente de adenocarcinoma de cérvix obtenido de una persona caucásica de 66 años. Esta línea forma tumores en ratones desnudos<sup>6</sup>.

HeLa: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, fueron aisladas de una paciente negra de 31 años de edad. Crece de forma adherente y posee la secuencia del virus del papiloma humano 18. Es la línea celular más ampliamente estudiada<sup>6</sup>.

MCF-7: Células de carcinoma de mama humano; presenta características diferenciales de las células epiteliales de mamífero, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógeno citoplasmáticos. Proviene de una mujer caucásica de 69 años y puede contener la información del virus del papiloma B O C<sup>6</sup>.

SW480: Células de adenocarcinoma colorrectal y fue aislada por A. Leibovitz. Es tumorigenica en ratones desnudos y produce el antígeno carcinoembrionario. Su morfología es epitelial<sup>6</sup>.

K562: Células de leucemia mielogénica crónica humana, obtenida de la pleura de una mujer de 59 años en fase terminal<sup>6</sup>.

## 6.2. SOLUCIONES

A continuación se menciona el material, los reactivos y los procedimientos que se siguieron para preparar las soluciones.

### 6.2.1. SOLUCIÓN DE MTT

MTT (Sigma)	50mg
PBS	10mL

- Se pesó el MTT utilizando guantes debido a la toxicidad del compuesto.
- Se hizo una solución 5mg/mL de MTT en PBS utilizando un tubo Falcon como contenedor.
- Se esterilizó por filtración usando membrana Millipore de 0,22µM
- Se cubrió el tubo con papel aluminio y se conservó en refrigeración.
- La solución es estable durante un mes, después de este tiempo no se recomienda utilizar la solución.

### 6.2.2. MEDIO DE CULTIVO

Medio D-MEM (Gibco)	un sobre
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10mL
HEPES(Sigma)	2.2g
L-Piruvato (Gibco)	10mL
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma)	3.7g
Agua desionizada	c.b.p 900mL
Suero Fetal Bovino inactivado (Gibco)	100mL

- Se disolvió el contenido del sobre del medio de cultivo en 700mL de agua desionizada estéril, al igual que los complementos usando agitador magnético.
- Se agregó agua desionizada estéril para completar 900mL.
- Se esterilizó el medio por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 µM.
- Se colocó una alícuota del medio de cultivo en una caja Petri estéril y se incubó a 37°C como control de esterilidad.



- Se tomo del medio de cultivo alícuotas y se colocaron en botellas de vidrio estériles, posteriormente se refrigeraron para su conservación.
- Antes de usarse el medio se complementó con 10% de suero fetal bovino inactivado
- No es recomendable usar este medio después de 30 días desde su elaboración

### 6.2.3. PBS-EDTA

NaCl (J.T.Baker)	8.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	0.24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	1.44g
KCl (J.T.Baker)	0.2g
EDTA disódico (Sigma)	0.372g
Agua destilada	c.b.p 1000mL

- Se disolvieron todas las sales en 900mL de agua desionizada.
- Se aforo a un litro utilizando un matraz volumétrico y se homogeneizo la solución
- Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH o HCl diluido.
- Se esterilizó en autoclave y se conservó a temperatura ambiente o en refrigeración.

### 6.2.4. PBS

NaCl (J.T.Baker)	8.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma)	0.24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	1.44g
KCl (J.T.Baker)	0.2g
Agua destilada	c.b.p 1000mL

- Se procedió igual que para el PBS-EDTA

### 6.2.5. MEDIO DE CONGELAMIENTO

Medio de cultivo	80mL
Suero fetal bovino inactivada (Gibco)	20mL
Glicerol estéril (Merck)	17.5mL

- Se mezclaron todos los ingredientes en un matraz estéril hasta que la disolución fuera homogénea.
- Se tomaron alícuotas de 20mL y se colocaron en recipientes estériles, posteriormente se conservaron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$
- Al momento de utilizarse se descongeló y se tomó la cantidad a usar y el sobrante se congeló nuevamente

### 6.3. COMPUESTOS EMPLEADOS

#### 6.3.1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE LAS AMIDAS $\alpha,\beta$ -INSATURADAS DERIVADAS DE FURANO

Se pesaron las siguientes cantidades de cada compuesto

Compuesto 1= 0.0012g    Compuesto 2=0.0011g    Compuesto 3=0.0013g

Compuesto 4=0.0011g    Compuesto 5=0.0012g    Compuesto 6=0.0014g

Compuesto 7=0.0017g    Compuesto 8=0.0012g    Compuesto 9=0.0011g

Se disolvieron en 50  $\mu$ L de DMSO y de estas soluciones se tomaron los volúmenes adecuados a fin de tener en los pozos las diferentes concentraciones a evaluar: 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu$ M.

## 6.4. CITOTOXICIDAD

### 6.4.1. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Todos los procedimientos se realizaron dentro de una campana de flujo laminar. El material utilizado en la manipulación del medio de cultivo o líneas celulares se encontraba estéril y limpio

### 6.4.2. DESCONGELAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

- a) Se preparó el medio de cultivo D-MEM y se atemperó a 37 °C aproximadamente. Posteriormente se colocaron 3.5 mL de medio de cultivo en una caja Petri de 5 cm de diámetro previamente rotulada.
- b) Se sacó un criotubo del banco de células contenidas en nitrógeno líquido ( $N_2L$ ) y se descongeló el contenido con agua tibia o con ayuda de la temperatura corporal.
- c) Se agregó el contenido del criotubo en la caja Petri y se distribuyó el contenido con movimientos circulares suaves.

- d) Se incubó a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> por dos horas o hasta que las células se adherieron a la superficie de la caja Petri una vez realizado esto, se cambió el medio de cultivo por medio fresco.

#### 6.4.3. PROPAGACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Se observó el cultivo celular en un microscopio invertido, después de su descongelamiento, con la finalidad de observar el grado de confluencia el cual fue de 80-90%.

Para subcultivar las células

- a) Se aplicaron movimientos circulares suaves a la caja Petri que contenía las células y el sobrenadante se decantó o se succionó con ayuda de una pipeta Pasteur.
- b) Se llevó a cabo un lavado con PBS-EDTA y se decantó una vez más el sobrenadante.
- c) Se adicionó PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular formada en el fondo de la caja Petri y se incubó a 37°C por 5 ó 10 minutos.
- d) Concluido el tiempo de incubación se desprendieron las células con ayuda de una pipeta Pasteur vertiendo el PBS-EDTA sobre la monocapa celular hasta observar turbidez en la suspensión celular.

- e) Se disgregaron las células desprendidas succionando y expulsando suavemente el PBS-EDTA hasta que se observa, por medio de un microscopio, que se tienen en su mayoría células individuales.
  
- f) Se adicionó una alícuota de la suspensión celular en una caja con medio de cultivo previamente atemperado a 37°C y se distribuyó uniformemente las células con movimientos circulares suaves.
  
- g) Se dejó que las células sedimentaran aproximadamente 10 minutos colocando la caja Petri sobre una superficie horizontal y plana, posteriormente se incubó a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda.

#### 6.4.4. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES.

La línea de cultivo que se requirió congelar debió poseer una confluencia alta y se realizaron los pasos a-f de la sección anterior, una vez hecho esto se procedió de la siguiente manera:

- a) La suspensión celular se colectó con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de centrifuga. Se centrifugo la suspensión celular a 2000 r.p.m durante 5 min.
  
- b) Con el botón celular en el fondo del tubo, se decantó el PBS-EDTA y se resuspendió el botón con el PBS-EDTA residual con ayuda de suaves golpes al tubo.

- c) Se adicionaron 4.5 mL de medio de congelamiento por cada caja de cultivo cosechada y se homogeneizó con pipeta Pasteur para lograr una suspensión celular uniforme
- d) Se tomaron alícuotas de 1mL de la suspensión y se colocaron en criotubos.
- e) Se congelaron los criotubos en posición vertical a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 2-4 horas.
- f) Se introdujeron los criotubos en nitrógeno líquido.

#### 6.4.5. CONTEO CELULAR EN LA CÁMARA DE NEWBAUER.

- a) La cámara de Newbauer se limpió con etanol al 70% antes de ser usada, se secó y se colocó en una superficie horizontal.
- b) Se tomó una alícuota de la suspensión celular (aproximadamente  $25\mu\text{L}$ ) y se colocó en la cámara de Newbauer.
- c) Se dejó reposar unos minutos para que las células se sedimentaran (no más de 5 min. Para evitar que la muestra se seque).
- d) Se colocó sobre el microscopio la cámara de Newbauer y se contaron las células localizadas en los 8 cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos siguiendo el siguiente criterio: De los 16 cuadros que comprenden cada cuadrante se tomara para contar en cada cuadro las células que estén dentro de él y si hay células que se

encuentren en los límites se toman dos lados de tal forma que formen una “L” invertida. Las células que se encuentren entre estos lados solamente se adicionan al cuadro que se estaba contando, esto con el fin de evitar que una célula se tome en cuenta para dos cuadros o más.

- e) Cuando se obtenga el promedio de las ocho cuadrículas se aplica la siguiente fórmula:

$$S = (P) (1 \times 10^4)$$

Donde:

S = Células en un mililitro de suspensión.

P = Promedio de células encontradas en los 8 cuadrantes de la cámara de Newbauer.

Al obtener el número de células por mL se puede calcular el volumen de suspensión adecuado para agregar en cada pozo aproximadamente 6000 células y realizar el ensayo de citotoxicidad.

#### 6.4.6. EXPOSICIÓN A LOS DIFERENTES COMPUESTOS

Todos los procedimientos se realizaron dentro de la campana de flujo laminar excepto el conteo celular. Todo el material utilizado en la manipulación de medio de cultivo y líneas celulares fue estéril y limpio. Se contó con cultivos celulares de confluencia alta (> 80 %), y se realizó el siguiente procedimiento.

- a) Se atemperó el medio de cultivo y el PBS-EDTA
- b) Se decantó el medio de cultivo de la(s) caja(s) Petri que contiene(n) la línea celular.

- c) Se agregó 3mL de PBS-EDTA para lavar las células y se decantó. El procedimiento se repitió dos veces más.
  
- d) Se agregó PBS-EDTA suficiente para cubrir las células y alcanzar 2-4 mm de altura aproximadamente en la(s) caja(s) Petri y se incubó de 10 a 15 minutos a 37 °C , 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda.
  
- e) Posteriormente, con una pipeta Pasteur se resuspendió el PBS-EDTA para desprender las células que se encontraban adheridas. Se resuspendieron de 15 a 20 veces más hasta que la suspensión fue homogénea y las células disgregadas en forma individual.
  
- f) Se realizaron las diluciones pertinentes con medio de cultivo, homogeneizando la suspensión celular y se contó la cantidad de células en la cámara de Newbauer.
  
- g) Se agregaron aproximadamente 6000 células por cada pozo en una placa de cultivo de 96 pozos utilizando un volumen de suspensión celular de 30 a 50 µL por pozo.
  
- h) Se agregó medio de cultivo c.b.p 200 µL, se rotuló la placa e incubó a 37 °C , 5 % de CO<sub>2</sub> y en atmósfera húmeda por 24 horas.



- i) Al término de la incubación, se agregó el compuesto de prueba, el cual se diluyó con medio de cultivo de tal manera que se agregaron 50  $\mu\text{L}$  más por cada pozo para completar 250  $\mu\text{L}$  por pozo y así obtener la concentración deseada.
- j) Se incubó las placas de 96 pozos por 48 horas a 37  $^{\circ}\text{C}$  , 5 % de  $\text{CO}_2$  y en atmósfera húmeda.
- k) Al finalizar la incubación se midió la viabilidad celular por la técnica del MTT.

#### 6.4.7. TÉCNICA DEL MTT

- a) La placa de cultivo se invirtió rápidamente y se removió el medio de cultivo que contiene el compuesto, con esta técnica se ha observado que se pierde menor cantidad de células que por aspirado.
- b) Se adicionó 230 $\mu\text{L}$  de medio de cultivo fresco y atemperado en cada pozo y se agregó 20 $\mu\text{L}$  del reactivo de MTT a una concentración de 5mg/mL.
- c) Se incubaron las células en contacto con la solución de MTT por un mínimo de 4 horas. La reducción del MTT se llevó a cabo cuando se observa que el medio de cultivo se torna rojo oscuro.

- d) Se removió el medio con MTT decantando la placa.
- e) Se resuspendieron los cristales de Formazan del MTT sedimentados en el fondo de cada pozo con 250µL de DMSO.
- f) Se leyeron las placas en un lector de Elisa con un filtro de 550nm.

El porcentaje de células vivas se calcula con respecto a un control negativo utilizando la siguiente formula

$$\% \text{ inhibición} = 100 * [ 1 - (\text{Abs muestra} / \text{Abs control}) ]$$

- g) A aquellos compuestos que muestren un significativo % de inhibición del crecimiento celular se les calculara el valor de IC<sub>50</sub> en las diferentes líneas celulares

## 6.5. CITOMETRÍA DE FLUJO.

### 6.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- a) Se despegan las células tratadas y no tratadas con 4 mL de PBS-EDTA durante 10 minutos y se pasan a tubos Falcon de 15 mL.

- b) Se centrifugan las muestras a 2000 r.p.m durante 5 minutos.
  
- c) Se decanta totalmente el PBS-EDTA y se adiciona al paquete de células 5 mL de etanol al 70%.
  
- d) Se almacenan las células en suspensión a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que es la temperatura de fijación. Las células fijadas deben utilizarse durante las siguientes dos semanas.
  
- e) Se centrifugan las células fijadas a 2500 r.p.m durante 5 minutos y el etanol se decanta.
  
- f) Posteriormente se adiciona 5mL de PBS a los botones celulares y se centrifugan a 2000 r.p.m durante 5min.
  
- g) Se decanta el PBS y se adiciona a los botones celulares 2mL de una solución de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de yoduro de propidio y Triton X-100 .
  
- h) Se adicionan 10  $\mu\text{L}$  de ARNasa a una concentración de 1mg/mL.
  
- i) Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson. San Jose. CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. CITOTOXICIDAD DE LAS AMIDAS $\alpha,\beta$ -INSATURADAS DERIVADAS DE FURANO

El cáncer es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial y en nuestro país ocupa un lugar importante dentro de las enfermedades de mayor índice de mortalidad<sup>22,79</sup>. Una de las principales herramientas con las que se cuenta actualmente para su tratamiento es la quimioterapia<sup>36a,59</sup>. Los fármacos que se utilizan poseen efectos adversos que pueden ser severos, costosos y no siempre se obtienen los resultados deseados. Otro de los problemas que se tiene con el tratamiento de quimioterapia, es el hecho de que algunos tumores presentan mecanismos de resistencia a fármacos<sup>36a,48,59</sup>, por estos motivos la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antitumoral es de gran importancia.

En este trabajo se evaluó la posible actividad citotóxica, de 9 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano. (Figura 4).

Estos compuestos se probaron en 6 líneas celulares tumorales, CaLo, C-33 y HeLa (cáncer de cérvix humano), K-562 (leucemia mielogénica), MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria) y SW480 (adenocarcinoma colorrectal)<sup>6</sup>.

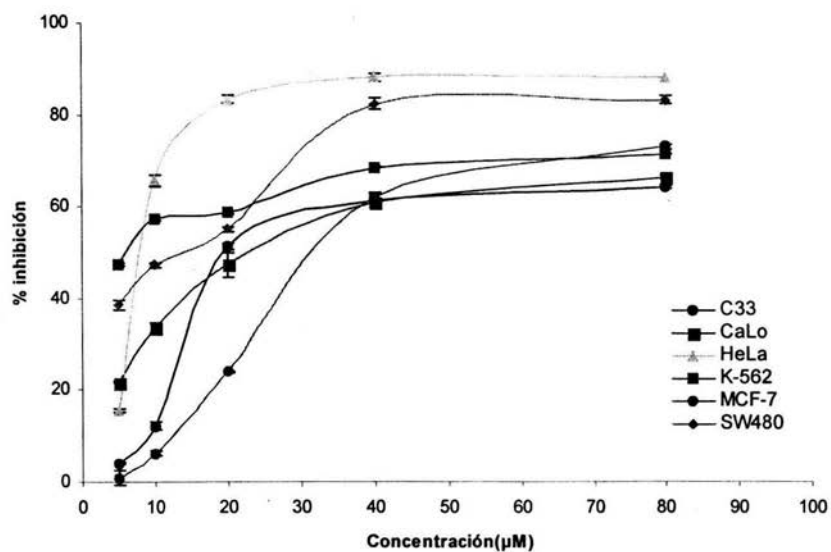
Los experimentos fueron llevados a cabo en placas de 96 pozos, en las cuales se colocaron 6000 células por pozo, y fueron incubadas por 24h, posteriormente se dejaron durante 48h en presencia de las diferentes concentraciones de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas

derivadas de furano. Como control positivo se utilizó el taxol a una concentración de 0.25  $\mu\text{M}$  y como control negativo se incubaron células en ausencia de los compuestos.

Las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano se disolvieron en DMSO como vehículo. Resultados previos de laboratorio demuestran que el DMSO tiene un efecto inhibitorio sobre las líneas celulares utilizadas, por lo que la cantidad máxima de DMSO por pozo era menor o igual a 0.2%, para descartar que el efecto inhibitorio sea debido al DMSO se realizó un control disolvente a una concentración de 0.2%.

Con el objetivo de determinar la  $\text{IC}_{50}$  de las diferentes amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas del furano se realizaron las curvas de viabilidad celular en función de la concentración ( 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{M}$  ), en las diferentes líneas celulares tumorales (CaLo, Hela, C-33, K-562, MCF-7 y SW480) después de 48h de tratamiento.

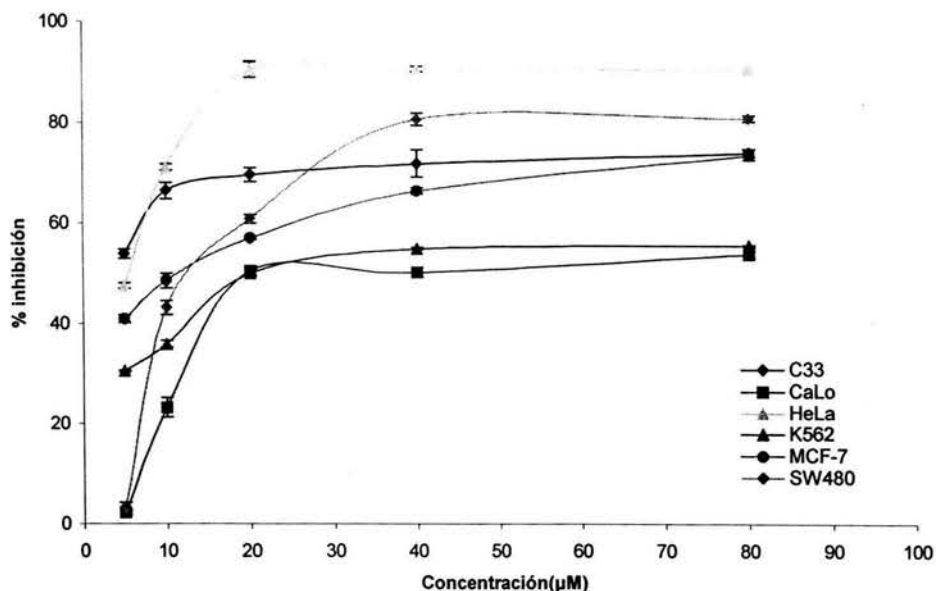
El (2*E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales evaluadas a las diferentes concentraciones después de 48 horas de exposición. La línea celular K-562 resultó ser la más sensible con una  $\text{IC}_{50}$  5.8  $\mu\text{M}$  , y la línea Hela le siguió en sensibilidad con una  $\text{IC}_{50}$  8.4  $\mu\text{M}$  (Tabla 2 y Gráfica 1). Por otra parte el compuesto 1 muestra una actividad citotóxica dependiente de la concentración hasta 40  $\mu\text{M}$  en la mayoría de las líneas celulares, después de esa concentración no se observó aumento en la inhibición en la proliferación celular. En la línea celular MCF-7 la actividad citotóxica por efecto del compuesto 1 fue dependiente de la concentración hasta 80  $\mu\text{M}$ .



Gráfica 1.- Actividad citotóxica del (2E)-N-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la evaluación de la citotoxicidad se describe en la sección de la metodología 5.2.6. Los resultados fueron obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

El (2*E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluorometil)benzil]acrilamida (compuesto 2) al igual que el anterior compuesto presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales después de 48 horas de tratamiento (Gráfica 2). C-33 resultó ser la más sensible con una IC<sub>50</sub> de 3.6 µM, siguiéndole HeLa con una IC<sub>50</sub> de 5.3 µM.

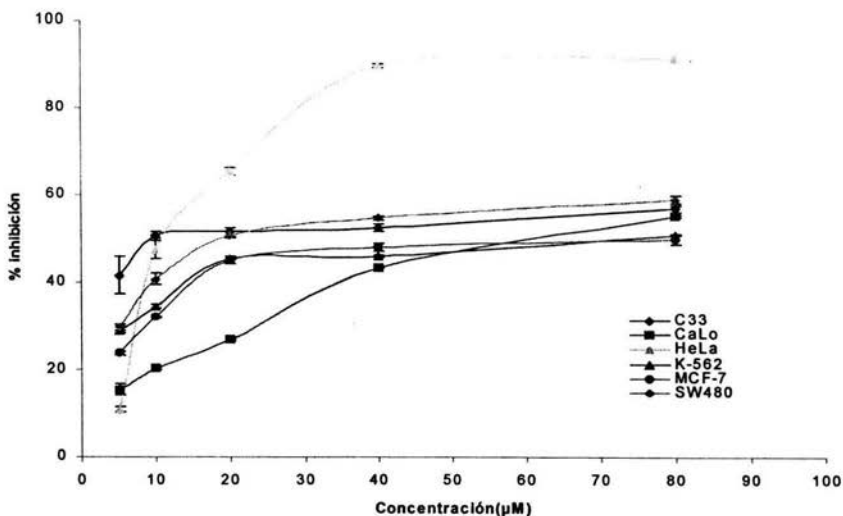
El compuesto 2 presentó una actividad citotóxica dependiente de la concentración hasta 20 µM en las líneas celulares CaLo, HeLa, C-33 y K-562, después de esa concentración se alcanza una fase de meseta en el % de inhibición celular. En la línea celular SW480 la inhibición de la proliferación celular por efecto del compuesto 2 es dependiente de la concentración hasta 40 µM.



Gráfica 2.- Actividad citotóxica del (2*E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluorometil)benzil]acrilamida (compuesto 2). Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

El (2*E*)-*N*-(3-fluorobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 3) al igual que los compuestos 1 y 2 presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales, después de un periodo de tratamiento de 48 horas (Gráfica 3). De las líneas utilizadas C-33 y HeLa fueron las más sensibles con una IC<sub>50</sub> de 9.7 μM y 10.3 μM respectivamente.

Las líneas celulares SW480, MCF-7 y K-562 con el compuesto 3 presentaron inhibición en el crecimiento celular dependiente de la concentración hasta 20 μM, después de esa concentración no se observó aumento en la actividad citotóxica, en la línea celular HeLa la concentración a la cual se alcanzó el efecto máximo fue a 40 μM, mientras que para la línea celular CaLo la actividad citotóxica fue dependiente de la concentración hasta la concentración máxima probada 80 μM.

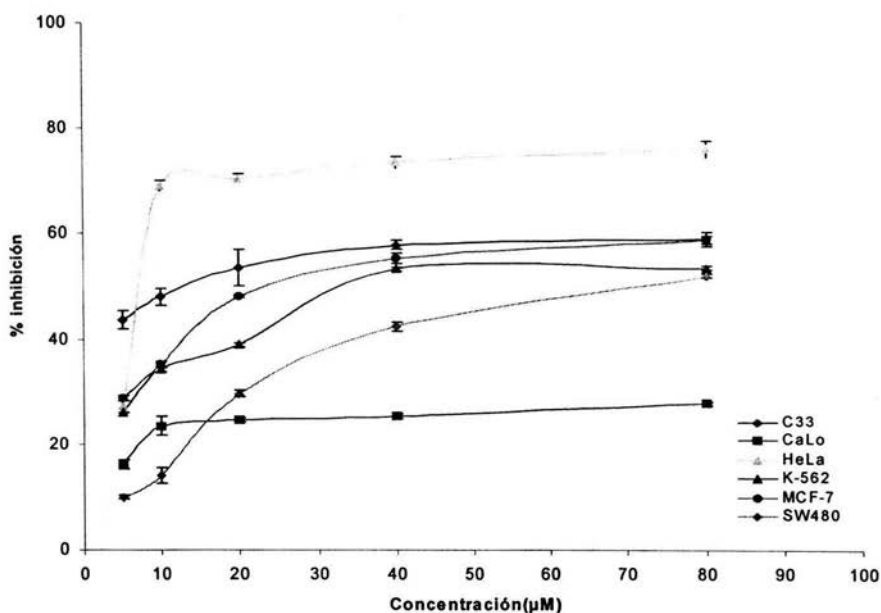


Gráfica 3.- Actividad citotóxica del (2*E*)-*N*-(3-fluorobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 3). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.



El (2*E*)-*N*-(3-methylbenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 4) presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales, excepto en Calo, (Gráfica 4). De las líneas celulares tumorales HeLa resultó ser la más sensible con una IC<sub>50</sub> de 7.6 μM y C-33 con una IC<sub>50</sub> de 13.9 μM.

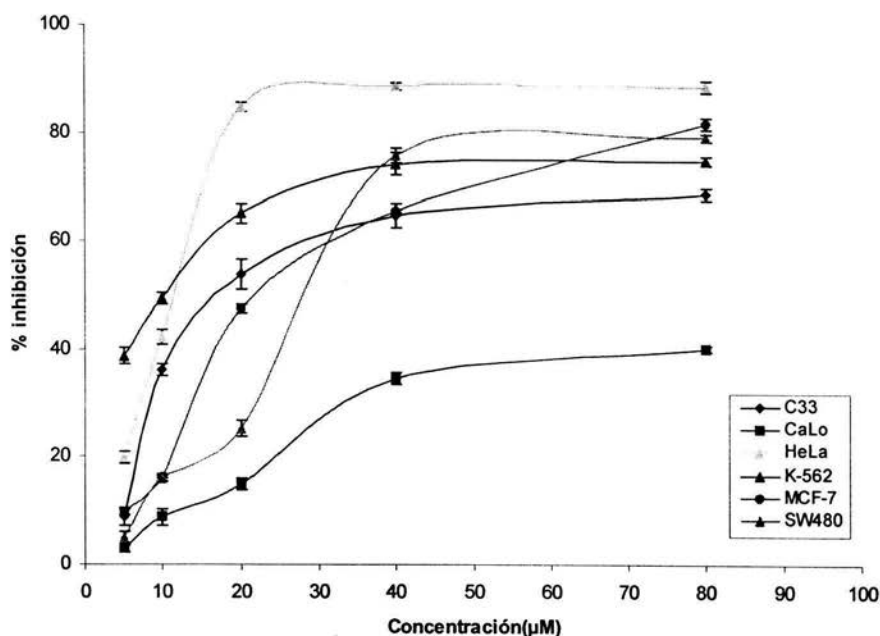
En la línea celular CaLo la concentración del compuesto 4 a la que se alcanzó el efecto máximo fue a 10 μM, mientras que para C-33, HeLa, K-562 y MCF-7 fue a 40 μM. Para la línea celular SW480 la actividad citotóxica fue dependiente de la concentración hasta 80 μM.



Gráfica 4.- Actividad citotóxica del (2*E*)-*N*-(3-methylbenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 4). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

El (2*E*)-*N*-(secbutil)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 5), presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales, excepto Calo. Como se puede observar de los resultados obtenidos, las líneas HeLa y K-562 fueron las más activas con IC<sub>50</sub> de 11.1µM y 10.5 µM (Gráfica 5).

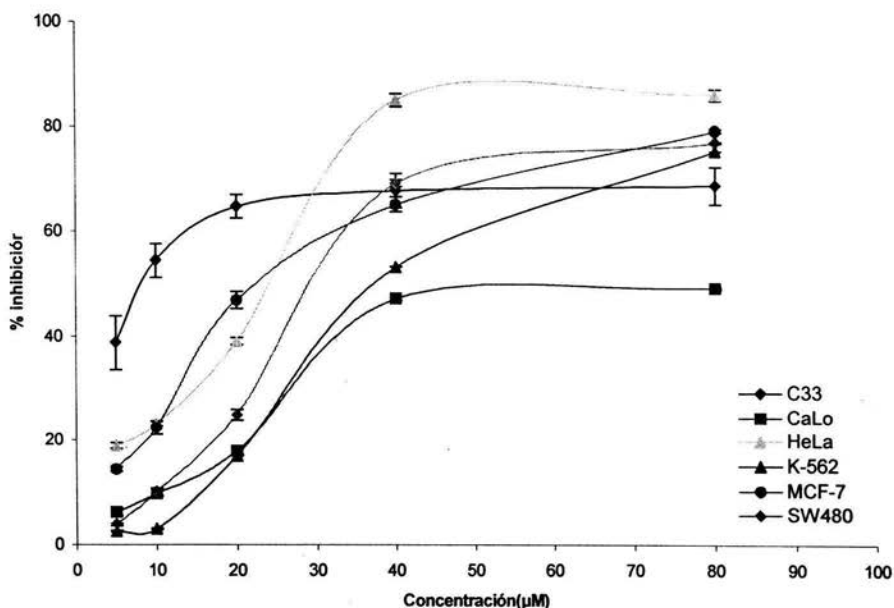
Las líneas celulares CaLo, C-33, HeLa, K-562 y SW480 presentaron con el compuesto 4 inhibición en la proliferación celular dependiente de la concentración hasta 40 µM, mientras que para la línea celular MCF-7 el efecto máximo se alcanzó hasta 80 µM.



Gráfica 5.- Actividad citotóxica del (2*E*)-*N*-(1-ethylpropyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 5) . Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

El (2*E*)-*N*-isobutyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 6), presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales excepto en Calo. La línea celular más sensible fue C-33 con una IC<sub>50</sub> de 8.6 μM.

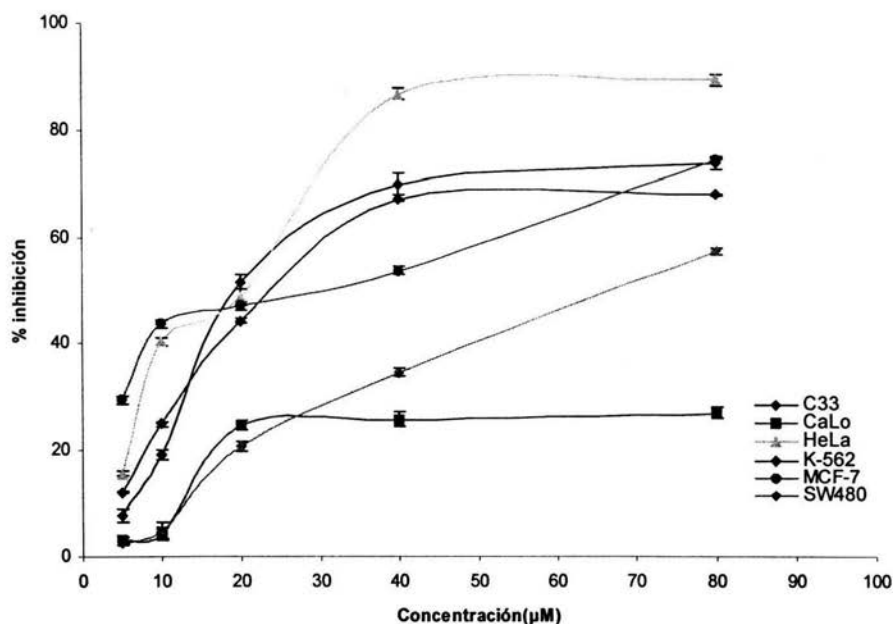
La línea celular C-33 con el compuesto 3 presentó un efecto máximo en la inhibición del crecimiento celular a 20 μM, después de esta concentración alcanza una fase de meseta, mientras que para CaLo, HeLa y SW480 fue a 40 μM. Por otra parte las líneas K-562 y MCF-7 presentaron inhibición del crecimiento celular dependiente de la concentración hasta 80 μM.



Gráfica 6.- Actividad citotóxica del (2*E*)-*N*-isobutyl-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 6). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

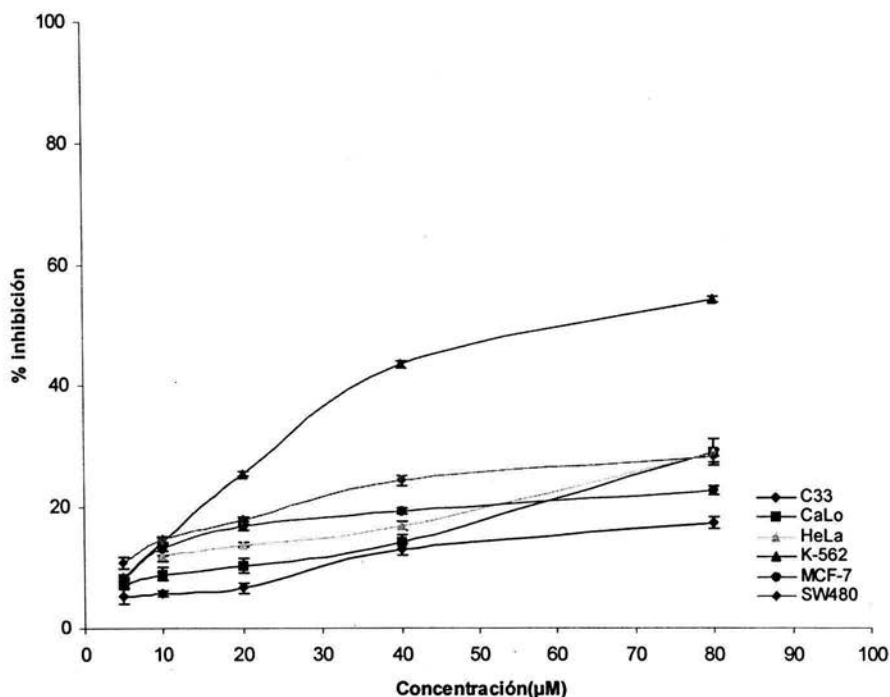
El (2E)-3-(2-furyl)-N-isopropylacrylamide (compuesto 7), presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales excepto en Calo, siendo la mas sensible C-33 con una IC<sub>50</sub> de 19.6 µM y una inhibición en la proliferación celular dependiente de la concentración hasta 40 µM.

Para las líneas celulares HeLa y K-562 la inhibición en la proliferación celular fue dependiente de la concentración hasta 40 µM, mientras que para MCF-7 y SW480 fue hasta 80 µM.



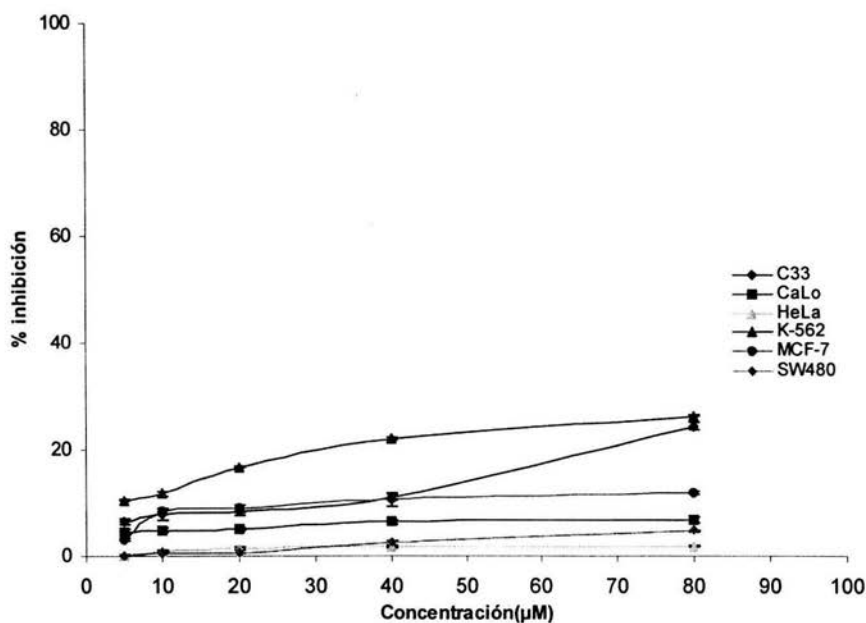
Gráfica 7.- Actividad citotóxica del (2E)-3-(2-furyl)-N-isopropylacrylamide (compuesto 7). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

Las diferentes concentraciones a las cuales se probó el (2*E*)-3-(2-furyl)-*N*-isobutylacrylamide (compuesto 8) no fueron suficientes para alcanzar un % de inhibición mayor al 50% a excepción de la línea celular K-562. En este caso se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 54.9 μM y la inhibición del crecimiento celular fue dependiente de la concentración hasta 80 μM.



Gráfica 8.- Actividad citotóxica del (2*E*)-3-(2-furyl)-*N*-isobutylacrylamide (compuesto 8). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

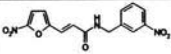
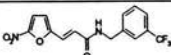
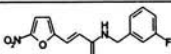
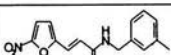
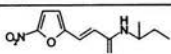
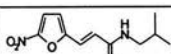
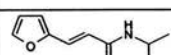
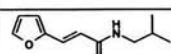
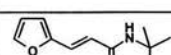
El (2*E*)-*N*-(*tert*-butyl)-3-(2-furyl)acrylamide (compuesto 9) evaluado en las diferentes líneas celulares tumorales como se muestra en la gráfica 9, resultó menos activo que los compuestos anteriormente mostrados.



Gráfica 9.- Actividad citotóxica del (2*E*)-*N*-(*tert*-butyl)-3-(2-furyl)acrylamide (compuesto 9). Dicho compuesto se probó en las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de la metodología 5.2.6..Los resultados son obtenidos a 48 h de exposición del compuesto. Estos resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por cuadruplicado  $\pm$  DS.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad citotóxica, se observa que la mayoría de los compuestos excepto el compuesto 8 y 9 mostraron actividad citotóxica en las diferentes líneas celulares evaluadas. De manera general se puede observar que la línea celular menos sensible a los compuestos (4-9) fue Calo.

Tabla 2.- Determinación de la IC<sub>50</sub> (μM) para las amidas α,β-insaturadas derivadas de furano en diferentes líneas celulares tumorales.

Comp.	Estructura	C-33 IC <sub>50</sub> μM	CaLo IC <sub>50</sub> μM	HeLa IC <sub>50</sub> μM	K-562 IC <sub>50</sub> μM	MCF-7 IC <sub>50</sub> μM	SW480 IC <sub>50</sub> μM
1		19.7±0.4	22.4±1.5	8.4±0.1	5.8±0.7	31.8±1.5	15.7±0.6
2		3.6±0.1	19.7±1.5	5.3±0.1	20.2±0.3	11.9±0.7	12.7±0.3
3		9.7±0.8	53.8±0.7	10.3±0.1	73.8±0.9	66.8±0.7	18.9±1.3
4		13.9±2.2	>80	7.6±0.1	35.1±0.8	23.7±0.8	64.3±0.6
5		16.1±0.7	>80	11.1±0.2	10.5±0.6	24.2±0.6	27.6±0.4
6		8.6±1.3	>80	24.2±0.4	38.1±0.1	23.8±0.8	29.1±0.5
7		19.6±0.5	>80	21.5±0.7	22.7±0.1	27.9±1.3	63.8±0.6
8		>80	>80	>80	54.9±1.4	>80	>80
9		>80	>80	>80	>80	>80	>80

Por otra parte también se observa que los compuestos 1 y 2 fueron los más activos en todas las líneas celulares evaluadas con  $IC_{50(s)}$  de 3.6 hasta 31.8  $\mu\text{M}$ . Así como en el caso de los compuestos 5 y 6 que presentaron una  $IC_{50}$  desde 8.6 hasta 38.1  $\mu\text{M}$  en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas, lo que sugiere que existe sensibilidad y selectividad celular y por lo tanto estos compuestos pueden ser potencialmente utilizados en terapias contra diferentes tipos de cáncer.

## 7.2. CITOMETRIA DE FLUJO PARA LAS AMIDAS $\alpha,\beta$ -INSATURADAS DE FURANO.

Basados en el hecho de que diversos fármacos anticancerígenos inducen arresto del ciclo celular<sup>31,50,54,72,82</sup>, se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo con el objeto de determinar si los compuestos ( *2E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto1) y el (*2E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) inducen efectos sobre la distribución del ciclo celular

### **Efecto del ( *2E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide) (compuesto 1) en la línea K-562.-**

Debido a que el compuesto 1 ( *2E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide) fue el más potente en la línea K-562, se llevó a cabo el análisis del ADN, a 24, 48 y 72h a una concentración de 5.8  $\mu\text{M}$  ( $IC_{50}$ ).

El análisis del ciclo celular muestra un aparente arresto en la fase S donde el porcentaje de las células es de 61.57% y 59.33% a las 24h y 48h respectivamente, este porcentaje disminuye a 45.01% a las 72h, mientras que la fase G2/M disminuyó de 38.96%



a las 24h a 25.44% a las 72h. Por otra parte la fase G1/G0 aumento de 10.17% a 24h a 26.06% a 72h (Gráfica 10)

Por otra parte también se observó que el ( *2E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide) compuesto 1 indujo la aparición de una población de células con un contenido de ADN menor a 2n (subdiploide, sub G1) previo a la población de G0/G1 a las 24, 48 y 72h de tratamiento con 4.58, 10.54 y 22.99 % de células, lo cual es sugerente de apoptosis<sup>3,7,37</sup> (figura 7-D a 7-F y gráfica 10).

Como control negativo se utilizó células K-562 tratadas con dimetilsulfoxido (DMSO) y como control positivo taxol.

**Control negativo.-** En el control negativo como se observa en la figura 7-A,7-B y 7-C , no se presentó un pico de la fase sub- G1 a los tiempos de exposición 24,48 y 72h.

**Control positivo taxol.-** Como control positivo se utilizó taxol a una concentración de 0.25  $\mu$ M. de acuerdo a la Figura 7-G, 7-H y 7-I, se presentó un pico de la fase sub-G1 sugerente de un efecto apoptótico, en donde se observan 12.4% de células a las 24h de exposición y 38.25 % a las 48h; a las 72h no fue posible obtenerlo con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Sin embargo, en la figura 7-I si se observa el pico de la fase sub-G1. En el histograma a las 24h de exposición (Figura 7-G) se observa un arresto del ciclo celular en la fase G2/M en donde se encuentran 76.95% de las células. A las 48h de tratamiento el porcentaje de células disminuyó a 16.79% en esta fase. Por otra parte se observa que las células en fase S disminuyeron de 13.68% a las 24h de tratamiento

a 4.76% a las 48h, mientras que el porcentaje de las células en la fase G1/G0 a las 24h fue de 0.73% y a las 48h incrementó a 40.2%.

#### **Análisis del ADN en células C-33 tratadas con (2E)-3-(5-nitro-2-furyl)-N-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2).-**

El análisis del ADN en células C-33 tratadas con (2E)-3-(5-nitro-2-furyl)-N-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) se llevó a cabo a los tiempos 24, 48 y 72h a una concentración de 3.6  $\mu$ M (IC<sub>50</sub>). Los histogramas obtenidos por citometría de flujo se muestran en la figura 8.

Al igual que en el caso anterior concomitantemente se llevaron a cabo los controles en los que se utilizó como control negativo células C-33 tratadas con dimetilsulfóxido (DMSO) que fue el disolvente usado para preparar las soluciones del compuesto 2 y como control positivo taxol.

#### **Efecto del (2E)-3-(5-nitro-2-furyl)-N-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) en la línea C-33.-**

El análisis del ciclo celular muestra un aparente arresto en la fase S donde el porcentaje de las células a las 24h aumentó de 51.44% a 70.29% a las 48h y disminuyó a 40.08% a las 72h, mientras que la fase G2/M disminuyó de 33.39% a 24h a 19.38% a las 72h. Por otra parte la fase G1/G0 aumento de 15.17% a 24h hasta un 40.54% a 72h (Gráfica 11).

El compuesto 2 indujo un pico de la fase sub-G1 sugerente de apoptosis<sup>3,7,37</sup>, habiéndose obtenido 5.58% de células a las 24h, 15.14% a 48 h y 23.02% a las 72h de tratamiento (ver figura 8-D, 8-E y 8-F).

**Control negativo DMSO.-** Como se observa en la figura 8-A, 8-B y 8-C no se presentó un pico de subfase G1, a los tiempos de exposición de 24, 48 y 72h, además de que este disolvente no alteró las fases de ciclo celular.

**Control positivo taxol.-** Como control positivo se utilizó taxol a una concentración de 25µM. De acuerdo a la figura 8-G, 8-H, y 8-I, se presentó un pico de fase sub-G1 sugerente a un efecto apoptótico<sup>3,7,37</sup> de 11.7% a las 24h de exposición, de 38.22% a las 48h, a las 72h no fue posible obtenerlo con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Sin embargo, en la figura 8-I si se observa el pico de la fase sub-G1. Además se observó un arresto del ciclo celular en la fase G2/M en donde 74.88% de las células se encontraron a las 24h de exposición al taxol, mientras que a 48h de tratamiento el porcentaje de células disminuyó en esta fase a 15.35%. En la fase S el porcentaje de células disminuyó de 24.48% a las 24h de tratamiento a 6.84% a las 48h. Además de esto el porcentaje de las células en la fase G1/G0 a las 24h fue de 1.12%, y posteriormente aumentó a las 48h a 45.2%.

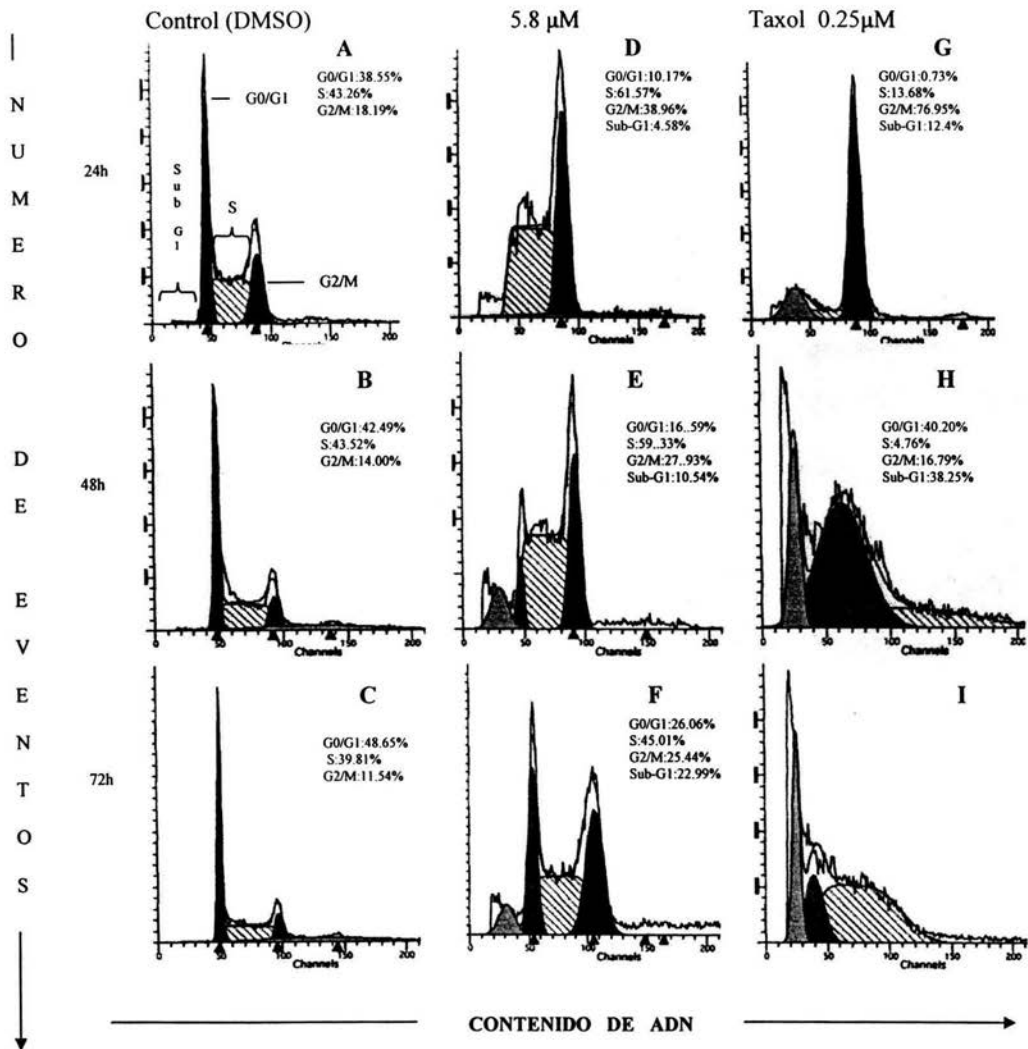


Figura 7.- Histogramas obtenidos de la citometría de flujo del compuesto No. 1 en células K-562 analizadas por fluorescencia de yoduro de propidio (contenido de ADN). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson. San Jose. CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Los histogramas A-C muestran el control disolvente (DMSO) a las 24, 48 y 72h, D-F muestran el tratamiento con el compuesto 1 (5.8 μM) a 24, 48, y 72 h. G-I muestran el control positivo (Taxol 0.25 μM) a 24, 48 y 72 h respectivamente. Los porcentajes de cada fase del ciclo celular mostrados para cada histograma son el promedio de tres experimentos independientes.

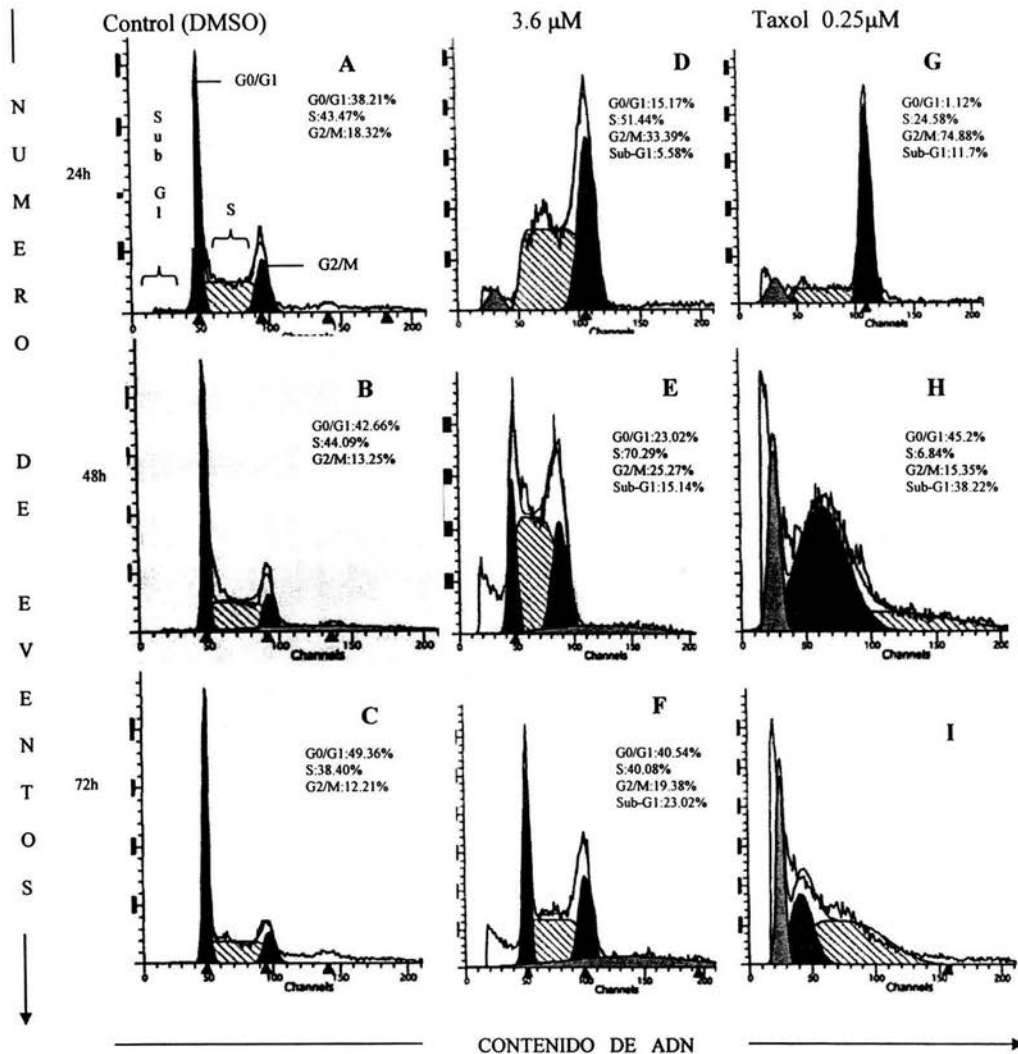
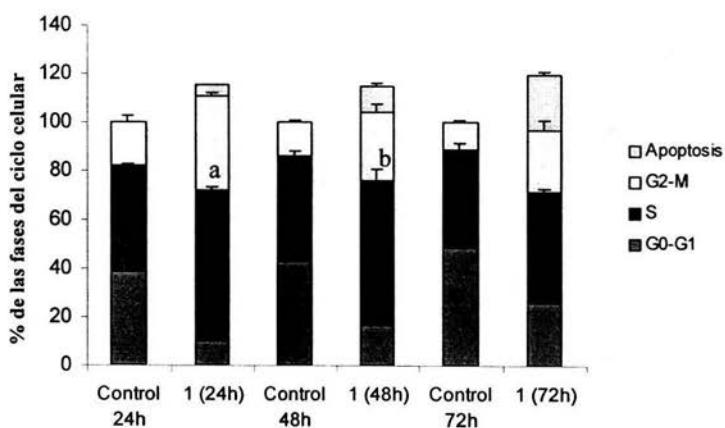
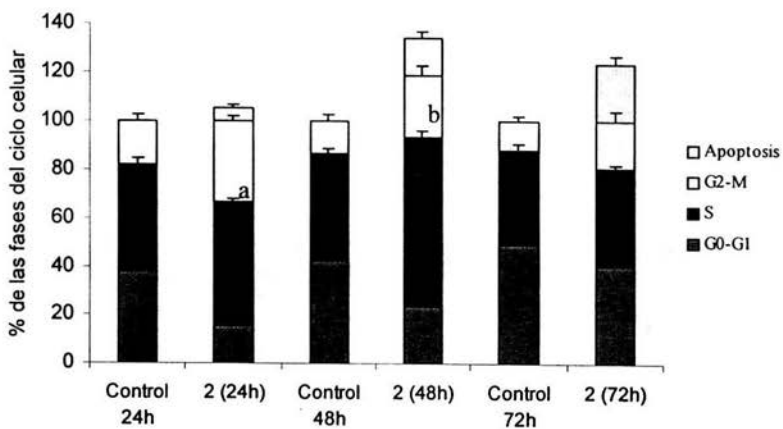


Figura 8.- Histogramas obtenidos de la citometría de flujo del compuesto 2 en células C-33 analizadas por fluorescencia de yoduro de propidio (contenido de ADN). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Acqcyte (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Los histogramas A-C muestran el control disolvente (DMSO) a las 24, 48 y 72 h, D-F muestran el tratamiento con el compuesto 2 (3.6 μM) a 24, 48 y 72 h. G-I muestran el control positivo (Taxol 0.25 μM) a 24, 48 y 72 h respectivamente. Los porcentajes de cada fase del ciclo celular mostrados para cada histograma son el promedio de tres experimentos independientes.



Gráfica 10. Distribución de las fases del ciclo celular por efecto de *2E*-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) a 5.8µM en células K-562. Los porcentajes de cada fase del ciclo celular son el promedio de tres experimentos independientes ± DS. <sup>a</sup>p<0.004 vs control 24h, <sup>b</sup>p<0.001 vs control 48h



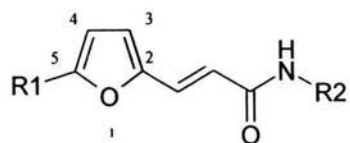
Gráfica 11.- Distribución de las fases del ciclo celular por efecto de *2E*-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) a 3.6µM en células C-33. Los porcentajes de cada fase del ciclo celular son el promedio de tres experimentos independientes ± DS. <sup>a</sup>p<0.008 vs control 24h, <sup>b</sup>p<0.001 vs control 48h

## 8. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó y determinó la actividad citotóxica de 9 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas del furano (Figura 4), que se sintetizaron utilizando como molécula líder el nifurtimox (Figura 2).

De acuerdo a las  $IC_{50(s)}$  y a las diferencias estructurales de los 9 compuestos evaluados en las diversas líneas celulares tumorales durante este trabajo, se observa que las amidas  $\alpha,\beta$  insaturadas derivadas de furano que presentan en R1 un grupo  $NO_2$  como sustituyente en la posición 5 del anillo de furano, como son los compuestos 1-6, presentaron una actividad citotóxica más elevada al tener una  $IC_{50}$  más pequeña en comparación de los compuestos que no presentan este grupo electroattractor como sustituyente en el anillo de furano, compuestos 7-9 (Figura 9).

Lo que sugiere que la presencia de este grupo electroattractor como sustituyente en la posición 5 del anillo de furano es indispensable para generar una mayor actividad citotóxica en las células tumorales. Resulta interesante tomar en cuenta que en el año de 1987, Mester y col. sintetizaron trece análogos del nifurtimox encontrando que aquellos compuestos que presentan el grupo 5-nitrofurano presentaron una mayor actividad citotóxica resultados similares a los mostrados en el presente trabajo experimental



Compuesto	R1	R2
1	NO <sub>2</sub>	
2	NO <sub>2</sub>	
3	NO <sub>2</sub>	
4	NO <sub>2</sub>	
5	NO <sub>2</sub>	
6	NO <sub>2</sub>	
7	H	
8	H	
9	H	

Figura 9. Diferencias estructurales de las 9 amidas  $\alpha, \beta$  insaturadas de furano.



La importancia del grupo  $\text{NO}_2$  en el anillo de furano para generar una mayor actividad citotóxica sugiere que probablemente estos compuestos tengan un mecanismo de acción similar al de su molécula líder, nifurtimox, en donde el  $\text{NO}_2$  puede sufrir una reducción por acción del NADPH<sup>13,23,24</sup> formando como primer producto el anión radical nitrofurano y bajo condiciones aeróbicas este puede generar especies reactivas de oxígeno como son el anión radical superóxido  $\text{O}_2^-$  y el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; moléculas que son moderadamente reactivas con las moléculas biológicas, sin embargo el peróxido de hidrógeno es muy reactivo en presencia de metales como el fiero y el cobre (reacción de Fenton), generando el radical libre hidroxilo, el cual es altamente reactivo y tal vez directamente responsable de la mayoría del daño oxidativo provocado por EROS<sup>12,20,39,51</sup>.

Este aumento en los niveles de ERO en las células, puede rebasar la capacidad reductora de estas, lo que resultaría en un estado de estrés oxidativo para la célula, y en consecuencia puede formar parte importante en el proceso de muerte, pues muchos agentes que inducen apoptosis son oxidantes o bien estimulan el metabolismo oxidativo de la célula<sup>73,76,95</sup>; sin embargo, el estrés oxidativo no forma parte de la maquinaria de muerte, ya que la apoptosis se lleva a cabo en condiciones donde la producción de EROS es mínima, por lo tanto, si dividimos el proceso de muerte en dos partes, la de activación y la de ejecución, lo más probable es que el estrés oxidativo participe en la fase de activación de la maquinaria de muerte, en lugar de formar parte del mecanismo que la ejecuta<sup>73,96</sup>.

Lo anterior podría ser la causa de que los compuestos con el grupo  $\text{NO}_2$  en el anillo de furano provoquen una mayor actividad citotóxica, sin embargo se necesitan más

experimentos para determinar si hay un incremento de EROS en aquellas moléculas con grupo NO<sub>2</sub> en comparación de las que no tienen este grupo.

Así, los compuestos con el grupo NO<sub>2</sub> en el anillo de furano provocaron una mayor actividad citotóxica en la células tumorales en comparación con aquellos compuestos como el 8 y 9 que no lo presentan, ya que su actividad citotóxica no fue relevante a las diferentes concentraciones. Por otro lado, es importante tener en cuenta que el compuesto 8 indujo inhibición en la proliferación celular solo en 1 de las 6 líneas evaluadas, lo que nos sugiere que existe selectividad de la línea celular K-562 hacia el compuesto 8 obteniéndose una IC<sub>50</sub> de 54.9 μM después de 48 h de tratamiento, también es importante mencionar que estructuralmente los compuestos 8 y 6 solo se diferencian por la presencia del grupo NO<sub>2</sub> en el anillo de furano, y a diferencia del compuesto 8, el compuesto 6 indujo inhibición en la proliferación celular en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas con IC<sub>50(s)</sub> de 8.6 a 38.1 μM lo que nos sugiere que la presencia de este grupo NO<sub>2</sub> en la molécula, además de aumentar la actividad citotóxica en las líneas celulares, las hace más sensibles hacia el compuesto 6.

El compuesto 7 en base a los resultados mostró una actividad citotóxica en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas con IC<sub>50(s)</sub> de 19.6 a 63.8 μM, en su estructura este compuesto, al igual que el compuesto 8 y 9, no presenta en R1 el grupo NO<sub>2</sub>, sin embargo este compuesto si presento actividad citotóxica; estructuralmente la única diferencia entre estos tres compuestos son las diferentes cadenas alifáticas en R2 sobre el nitrógeno de la amida, lo que parece estar relacionado con cambios más finos en la actividad de los compuestos.

Existen otras diferencias estructurales entre las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano, que podrían influir para que la actividad antitumoral se incremente. Dentro de estas diferencias pueden mencionarse las siguientes:

De las 6 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano que presenta el grupo  $\text{NO}_2$  en el anillo de furano, los compuestos 1-4 se diferencian del resto al presentar en R2 un anillo aromático mientras que los compuestos 5 y 6 presentan una cadena alifática (Figura 9).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los compuestos 5 y 6 presentaron  $\text{IC}_{50(s)}$  desde 8.6 hasta 38.1  $\mu\text{M}$  en 5 de las 6 líneas celulares evaluadas, mientras que para el compuesto 4 las  $\text{IC}_{50(s)}$  van de 7.6 a 35.1  $\mu\text{M}$  en 4 de las 6 líneas celulares evaluadas, lo que nos sugiere que la presencia del anillo aromático con un sustituyente metilo en la molécula del compuesto 4 le confiere cierta selectividad a la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales.

Por otra parte el compuesto 3 indujo una actividad citotóxica relevante en 3 de las 6 líneas celulares evaluadas con  $\text{IC}_{50(s)}$  desde 9.7 hasta 18.9  $\mu\text{M}$ , estructuralmente se diferencia de los compuestos 5 y 6 al presentar en R2 un anillo aromático y del compuesto 4 al presentar como sustituyente del anillo aromático un flúor, halógeno que retira carga electrónica del anillo aromático por efecto inductivo, aparentemente la presencia de este anillo aromático con un sustractor de electrones y con base a los resultados sugiere que existe cierta selectividad y sensibilidad de 3 líneas celulares hacia este compuesto.

De las 9 amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas del furano el compuesto 1 y 2 fueron los más potentes al inducir actividad citotóxica en todas las líneas celulares evaluadas y al presentar  $IC_{50(s)}$  más pequeñas en comparación del resto de los compuestos.

Estas diferencias en cuanto a su potencia y actividad citotóxica nos sugiere que la presencia de un anillo aromático sustituido por el grupo  $NO_2$  para el compuesto 1 y por trifluorcarbono en el compuesto 2 incrementan la actividad citotóxica en las líneas celulares evaluadas.

Es importante mencionar que de las 6 líneas celulares evaluadas, la línea menos sensible a la mayoría de los compuestos fue CaLo, la cual proviene de carcinoma de cérvix humano, sin embargo C-33 y HeLa que también son de carcinoma de cérvix humano si fueron sensibles a la mayoría de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano, esta diferencia en cuanto sensibilidad se pudiera deber a diferencias genéticas entre estas tres líneas celulares.

En términos generales se observó que las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas derivadas de furano que tienen un grupo  $NO_2$  en R1 y en R2 un anillo aromático con sustituyentes electroattractores resultaron tener mayor actividad citotóxica. Los compuestos 1 y 2 son los más activos, ya que presentan una  $IC_{50}$  más pequeña, en un intervalo de 5 – 31  $\mu M$  para el (2E)-N-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) donde la  $IC_{50}$  para la línea celular K-562 resultó ser de  $5.8 \pm 0.7 \mu M$  y entre 3 – 20.2  $\mu M$  para el (2E)-3-(5-nitro-2-furyl)-N-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) donde la  $IC_{50}$  para la línea celular C-33 resultó ser de  $3.6 \pm 0.1 \mu M$  (Tabla 2).

Con el objeto de conocer en que fase del ciclo celular actúan los compuestos más citotóxicos se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo.

El (*2E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) ,de acuerdo a la figura 7 y gráfica 10, induce en las células K-562 un arresto del ciclo celular en la fase S a las 24 y 48h, sin embargo a las 72h la población de células en S disminuye, lo que sugiere que las células K-562 son bloqueadas transitoriamente en la fase S por acción del compuesto 1 a las 24 y 48h de tratamiento, probablemente por una insuficiente replicación de ADN o por un daño en este, posteriormente algunas células se reintegran al ciclo celular para seguir con su división y otras se van a una posible apoptosis. Esta incapacidad de las células por mantener dicho arresto en la fase S se pudiera deber a que el posible daño provocado por el compuesto 1 en el ADN de algunas células no fue suficiente para hacerlo irreversible, por lo que las células se detienen en la fase S para reparar el daño y una vez hecho esto algunas células son capaces de seguir con el ciclo celular.

El (*2E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) induce un arresto en las células C-33 en la fase S a las 24h y 48h encontrándose un 70.29% de células en dicha fase, sin embargo a las 72h este porcentaje disminuye drásticamente hasta un 40.08%, lo que sugiere que las células C-33 sufren un bloqueo transitorio en dicha fase por acción del compuesto 2, al igual que el compuesto 1, algunas células al salir del arresto se reintegran al ciclo celular y otras se van a una posible apoptosis.

Existen en la literatura reportes de compuestos estructuralmente diferentes a las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas de furano que provocan arresto en la fase S del ciclo celular debido a una

inhibición de la actividad de Cdk2 que ocurre concomitantemente con la desaparición de p21<sup>cip</sup>, se sabe que estas moléculas juegan un papel central en la regulación del ciclo celular<sup>31,50,54,72,82,90,97</sup>, probablemente los compuestos 1 y 2 al inducir un bloqueo transitorio en la fase S induzcan un mecanismo semejante al de estos compuestos, pero se necesitan más experimentos para determinar si este es el mecanismo mediante el cual los compuestos 1 y 2 inducen arresto en S<sup>30,65,66</sup>.

## 9. CONCLUSIONES

- De la serie de amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas de furano evaluadas se determinó que los compuestos con mayor actividad citotóxica son el (2*E*)-*N*-(3-nitrobenzyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (compuesto 1) y el (2*E*)-3-(5-nitro-2-furyl)-*N*-[3-(trifluoromethyl)benzyl]acrylamide (compuesto 2) ya que presentaron las IC<sub>50</sub> más bajas, en un intervalo de 3 a 20  $\mu$ M para el compuesto 2 en las diferentes líneas celulares, siendo la más sensible C-33. Para el compuesto 1 el intervalo fue de 5 a 31  $\mu$ M, donde K-562 fue la más sensible.
  
- De acuerdo a las diferencias estructurales y a las IC<sub>50</sub> de los compuestos, el grupo NO<sub>2</sub> como sustituyente en la posición 5 del anillo de furano aumento significativamente la actividad citotóxica de las amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas de furano, resultados similares se obtuvieron con la presencia en R2 del anillo aromático sustituido en su mayoría por grupos electroattractores, por lo tanto es indispensable la presencia de estos grupos para que la actividad citotóxica se incremente.
  
- El compuesto 1 y 2 inducen en las células C-33 y K-562 un arresto transitorio en la fase S del ciclo celular a las 24 y 48h de tratamiento. así como la aparición de una población celular con un contenido de ADN menor a 2n previo a la población de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a las 24, 48 y 72h de tratamiento, lo cual es sugerente de una muerte por apoptosis<sup>3,7,37</sup>.

## 10. PERSPECTIVAS.

- Determinar si los compuestos 1 y 2 inducen en las células un incremento en el estrés oxidativo.
- Determinar el mecanismo por el cual los compuestos 1 y 2 inducen un arresto en la fase S del ciclo celular
- Determinar si la población celular que se encuentra en la fase Sub-G1 sufre apoptosis.



## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

### • 11. REFERENCIAS

1. Aguirre Gabriela., Cabrera Eliana., Cerecetto Hugo., Di Maio Rossana. Design, synthesis and biological evaluation of new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents. Studies of trypanothione binding site of trypanothione reductase as target for rational design. European Journal of Medicinal Chemistry, 2004, 39:421-431.
2. Albelda M. Steven. Biology of Disease, Role of Integrins and Other Cell Adhesion Molecules in Tumor Progression and Metastasis. The United States and Canadian Academy of Pathology., 1993, 68(1):1-17.
3. Alfaro M. Ernesto., García C. Claudia., Dueñas G. Alfonso. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. Cancerología., 2000, 46(4):275-280.
4. Antonsson Bruno., Martinou Claude-Jean. The Bcl-2 protein family. Experimental Cell Research., 2000, 256:50-57.
5. Ashkenazi Avi., Dixit M. Visha. Death receptors: signaling and modulation. Science, 1998, 281:1305-1308.
6. ATCC, Catalogue of Cell lines and Hybridomas, 7a ed. Rockville, Maryland, 1992, 4, 122, 123, 129, 130, 219, 220, 223p.
7. Belmokhtar Ahmed Chafké., Hillion Josette., Dudognon Charles, Fiorentino Susana. Apoptosome-independent pathway for apoptosis. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32):29571-29580.
8. Blackburn V. Robert., Spitz R. Douglas., Liu Xi., Galoforo S. Sandra., Sim E. Julia. Metabolic oxidative stress activates signal transduction and gene expression during glucose deprivation in human tumor cells. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(3/4):419-430.
9. Blagosklonny V. Mikhail. Apoptosis, proliferation, differentiation: in search of the order. Seminars in Cancer Biology, 2003, 13:97-105.
10. Blankenstein Thomas., Qin Zhihal. Chemical carcinogens as foreign bodies and some pitfalls regarding cancer immune surveillance. Cancer Research, 2003, 179-203.
11. Boehm Thomas., Folkman Judah., Browder Timothy. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. Nature, 1997, 390:404-407.

12. Caporossi Daniela., Ciafré Anna Silvia., Pittaluga Monica., Savini Isabella., Farace Giulia Maria. Cellular Responses to H<sub>2</sub>O and Bleomycin-induced Oxidative Stress in L6C5 Rat Myoblasts. *Free Radical Biology and Medicine*,2003,35(11):1355-1364.
13. Carballo Perea Alfredo Javier. Síntesis y actividad tripanocida de análogos de nifurtimox y benznidazol. Tesis Maestría, 2001. Facultad de Química, UNAM.
14. Carmichael J., Mitchell J.B. Chemosensitivity testing of human lung cancer lines using MTT assay. *BJC.*,1988, 540-547.
15. Chambers F. Ann., Hill P. Richard. Tumor Progression and Metastasis
16. Cohen S. Jack., Hogan E. Michael. Las nuevas medicinas genéticas. *Investigación y ciencia*, 1995, 38-44.
17. Colin S. Duckett., Craig B. Thompson. The control and execution of programmed cell death: an update. *Biochimica et Biophysica*, 1997, 1332:R45-R47.
18. Cory Suzanne., Adams M. Jerry. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life or death switch. *Nature reviews*, 2002,2:647-656.
19. Denny a. William. Prodrug strategies in cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.*, 2001, 36:577-595.
20. DeWeese L. Theodore., Hruszkewycz M. Andrew., Marnett J. Lawrence. Oxidative stress in chemoprevention trials. *Urology*, 2001,57(S4A):137-140
21. Diehl Alan J., Lin Douglas. Mechanism of cell cycle control: ligating the ligasa. *Biochemical Science*, 2004, 29(9):453-455.
22. División Técnica de Información Estadística en Salud. La mortalidad en la población,2001. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social.*,2003, 41(4):345-354.
23. Dubin M., Grinblat L., Fernandez S.H. , Stoppani A.O.M. Nitrofurán inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Federation of European Biochemical*, 1987, 220(1):197-200.
24. Eluani Cabrera Maribel. Síntesis de amidas  $\alpha,\beta$ -insaturadas del furano, con posible actividad tripanocida y determinación de su actividad larvicida en *Artemia Salina*. Tesis de Licenciatura en Química , 2003. Facultad de Química, UNAM.
25. Evan I. Gerard., Vousdent H. Karen. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 2001, 411:342-348.

26. Evans Patricia., Halliwell Barry. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Journal of nutrition*, 2001, 85(2):S67-S74.
27. Fearon R. E. Human cancer syndromes: Clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 1997, 278:1043-1048.
28. Fessenden J. Ralph., Fessenden S. Joan. Compuestos aromáticos policíclicos y heterocíclicos. En *Química Orgánica*. Cap16. pp.750-784. Grupo Editorial Iberoamérica, México.
29. Fesus Laszlo., J. A. Peter., Piacentini Mauro. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *European Journal of Cell Biology.*, 1991, 56:170-177.
30. Fisher D. E. The p53 tumor suppressor: Critical regulator of life and death in cancer. *Apoptosis*, 2001, 6(12):7-15.
31. Francois Jean., Faure Robert., Pledboeuf Bruno. Hyperoxia induces S-phase cell cycle arrest and p21 independent Cdk2 inhibition in Human Carcinoma T47D-H3 Cells. *Experimental Cell Research*, 2000, 256:347-357.
32. Fréchet Mathilde., Canitrot Yvan., Cazaux Christophe, Hoffmann Sébastien-Jean. DNA polymerase  $\beta$  imbalance increases apoptosis and mutagenesis induced by oxidative stress. *Federation of European Biochemical Societies*, 2001, 505:229-232.
33. Gary M. Williams. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology.*, 2001, 166:3-10.38.
34. Gehl Julie. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treatment Reviews*, 2003, 371-387.
35. Gómez González O. Erika., Zentella Alejandro. Apoptosis y muerte celular programada. *BEB.*, 2000, 17(3):105-114.
36. Goodman, G. A., Rall W. T., Nies J.A., Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Parte XIII: Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. Panamericana, México, 8ª Edición, 1991, 1163-1169p.
- 36b. 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, 1991, 1171-1222p.
37. Gorczyca Wojciech., Mirón R. Melamed., Zbigniew Darzynkiewicz. Analysis of Apoptosis by Flow Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, NJ, Human press, 217-238p.

38. Gould R. Alan. The role of apoptosis: Mechanisms, aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Medicine*, 2004, 97(4):476-487.
39. G. R. Allen., K. Balin Arthur. Effects of oxygen on the antioxidant responses of normal and transformed cells. *Experimental Cell Research*, 2003, 289:307-316.
40. Green M. Lora., Reade L. Jeanne., Ware F. Carl. Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Citotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines. *Journal of Immunological Methods.*, 1984,70:257-268.
41. Gringauz A. Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why, Cap 4 Anticancer Drugs and Their Mechanism of Action, Wiley-VHC Inc. Brooklyn, N.Y. 1997, 93-139p.
42. Gwyn T. Williams. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis., 1991, 65:1097-1098.
43. Hannun A. Yusuf. Apoptosis and dilema of cancer chemotherapy. *J. American Society of Hematology.*, 1997, 89(6):1845-1853.
44. Hartwell H. Leland., Kastan B. Michael. Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994, 266:1821-1828.55. Hoepfner J. Daniel., Hengartner O. Michael., Fisher E. David. Programmed cell death: from development to disease. *Biochimica et Biophysica*, 1996, 1242:217-220.
45. Hartwell. H. Leland., Szankasi P., Roberts J. C. Integrating genetic approaches into the discovery of anticancer drugs. *Science*,1997, 278:1064-1067.60.
46. Heussler T. Volker., Küenzi Peter., Rottenberg Sven. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology*, 2001, 31:1166-1176.
47. Hirose Masao., Nishikawa Akiyoshi., Shibutani Makoto., Imai Toshio., Shirai Tomoyuki. Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2002, 39:271-278.64.
48. Hong K. W., Sporn B. M. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 1997, 278:1073-1077.
49. Hotzel Cristian., Marotto Annalisa., Pindur Ulf. Design, synthesis, DNA-binding and cytotoxicity evaluation of new potencial combilexines. *European Journal of Medical Chemistry*, 2002, 37:367-378.

50. Jen Wei., Chao Yee., Hung Yi-Mei. S and G2 phase cell cycle arrest and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Experimental Cell Research*, 1998, 241: 66-75.
51. Kamat P. J., Devasagayam A. P. T. Oxidative damage to mitochondria in normal and cancer tissues, and its modulation. *Toxicology*, 2000, 155:73-82.
52. Kinnula L. Vuokko., Crapo D. James. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 36(6):718-744.
53. Kinnula L. Vuokko., Soini Ylermi., Pääkkö Paavo. Antioxidant enzymes and redox regulating thiol proteins in malignancies of human lung. *Federation of European Biochemical Societies*, 2004,1-6.
54. Kleinberger Nurit., Shelah Noa., Capone Ricardo., Gazit Aviv. Inhibition of Cdk-2 activation by selected Typhostins causes cell cycle arrest at late G1 and S phase. *Experimental Cell Research*, 1998, 241:340-351.
55. Klug S. William., Cummings R. Michael. *Conceptos de Genética*. Prentice may Iberia, Madrid, 1999, 625-648p.
56. Lee A. Eric., Keutmann K. Michael., Dowling L. Melissa., Harris Eleanor. Inactivation of the mitotic checkpoint as a determinant of the efficacy of microtubule- targeted drugs in killing human cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2004, 3(6):661-669.
57. Lockshin A. Richard., Zakeri Zahra. Programmed cell death and apoptosis: origins of theory. *Nature.*, 2001, 2:545-550.
58. Loechler L. Edward. *Molecular modeling in mutagenesis and carcinogenesis*. *Methods in enzymology*, 1991, 203:458-476.
59. López Carrillo Lizbeth. ¿Es prevenible el cáncer?. *Gaceta Médica de México.*, 2000, 135(4):447-451.
60. Mally Angela., Kevin Chipman James. Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology*, 2002, 180:233-248.
61. Marcondes G.C. Maria., Borelli Primavera., Yoshida Nobuko., Russo Momtchilo. Acute *Tripanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes and infection*, 2000, 347-352.
62. Matés M. José., Pérez Gomez Cristina., Núñez de Castro Ignacio. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 1999,32(8):595-603.

63. Mignotte Bernard., Vayssiere Luc-Jean. Mitochondrial control of apoptosis. *Cellular and Molecular Mechanisms*, 2001, 93-122.
64. Mills C. Jason. Mechanisms underlying the hallmark features of the execution-phase of apoptosis. *Cellular and Molecular Mechanisms*, 2001,1-38.
65. Moller Peter., Wallin Hakan., Knudsen E. Lisbeth. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological interactions*, 1996, 102:17-36.
66. Monks Anne., Scudiero Dominic., Shehan Philip. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute.*,1991, 93(11):757-766.
67. Montesano R., Hall J. Environmental causes of human cancers. *European Journal of Cancer*, 2001,37:S67-S87.
68. Morrison Thornton Robert., Boyd Neilson Robert. *Compuestos heterocíclicos*. En *Química Orgánica*. Cap.35 pp.1184-1204. Addison Wesley Longman. México, 1998.
69. Mosmann Tim. Rapid colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Citotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods.*,1983,65:55-62.
70. Murillo G., Salti G. I., Kosmeder W. Deguelin inhibits the growth of colon cancer cells through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. *European Journal of Cancer*, 2002, 38:2446-2454.
71. Navarro José., Obrador Elena., Carretero Juan., Petschen Ignacio. Changes in glutathione status an the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*,1999, 26(3/4):410-418.
72. N'cho Mathias., Brahmi Zacharie. Evidence that Fas-Induced Apoptosis leads to S Phase Arrest. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*, 2001, 62:310-319.
73. Nicotera Pierluigi., Melino Gerry. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene*, 2004, 23:2757-2765.
74. Noer. Bideré., A. Senik. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview., *Apoptosis*, 2001, 6:371-375.
75. Norishi Ueda., Gur p. Causal. Apoptotic Mechanisms in Acute Renal Failure. *The American Journal of Medicine.*, 2000, 108:403-415.

76. O. Hengartner Michael. The biochemistry of apoptosis., *Nature.*, 2000, 407:770-776.
77. Pagano Giovanni., Biase Antonella, Deeva B. Irina., Degan Paolo., Doronin K.Yuri. The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sciences*, 2001, 68:1735-1749.
78. Pandey M., A. Mathew., M. K. Nair. Cancer vaccines: a step towards prevention and treatment of cancer. *European Journal of Surgical Oncology*, 1999, 25:209-214.
79. Parkin DM., Muir CS. Estimates of the world wide frequency of sixteen major cancers. *Int. J. Cancer.*, 2001, 41:184-197.
80. Perera P. F. Environment and cancer: who are susceptible?. *Science*, 1997, 278:1068-1072.
81. Perwez s. Hussain., Lorne J. Hofseth., Curtis C. Harris. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer.*, 2001, 34:S7-S15.
82. Pia Longhese Maria., Clerici Michela., Lucchini Giovanna. The S-phase checkpoint and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.*, 2003, 532:41-58
83. Pratt B. William., Ruddon W. Raymond., Ensminger D. William., Maybaum Jonathan. *The Anticancer Drugs*, Oxford University, N.Y. 1994, 69-199p.
84. Qing Guo., Sic L. Chan., Inna Kruman. The Bcl-2 family and their actions within the molecular machinery of cell death. *Elsevier.*,2001,141-195.12.
85. Raff Martin. Cell suicide for beginners. *Nature.*,1998, 396:119-123.
86. Ramos Fuentes J. Feliciano. El cáncer como enfermedad genética. *Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza.*,2001, 1-13p.
87. Ranganath., N. Rao Nagashree. Role of Programmed Cell Death in Development. *International Review of Citology.*, 2001, 202:159-245.
88. Rich Tina., Allen L. Rachel., Wyllie H. Andrew. Defying death after DNA damage. *Insight review articles*, 2000, 407:777-788.
89. Rodríguez López Eva María. Síntesis de análogos de Nifurtimox con posible actividad leishmanicida y determinación de su actividad larvicida en *Artemia salina*. Tesis de Licenciatura de Químico, 2003, Facultad de Química, UNAM.

90. Sala Trepat Maria., Rouillard Danielle., Escarceller Monica. Arrest of S-phase progression is impaired in Fanconi Anemia cells. *Experimental cell research*, 2000, 260:208-215.
91. Sargent J. M., Taylor C. G. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *J. Cancer.*,1989, 60:206-210.
92. Shackelford E. Rodney., Kaufmann K. William., Paules S. Richard. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(9):1387-1404.
93. Shacter Emily., Williams A. Joy., Hinson M. Roger. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. *Blood*, 2000, 96(1): 307-313.
94. Sherr J. Charles. Cancer cell cycles. *Science*,1996, 274:1672-1677.
95. Shi Honglian., Hudson G. Laurie., Liu Jian Ke. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 1-9.
96. Stewart A. Zoe., D. Westfall Matthew., A. Pietenpol Jennifer. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, 1-7.
97. Stewart A. Zoe., Mays Deborah., A. Pietenpol Jennifer. Defective G1-S cell cycle checkpoint function Sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Research*,1999, 59:3831-3837.
98. Strasser Andreas., Connor O. Liam., Dixit M. Vishva. Apoptosis signaling. *Annu. Rev Biochem*, 2000,69:217-245.
99. Tolando Roberto., Jovanovic Aleksandra., Brigelius-Flohé Regina., Ursini Fulvio. Reactive oxygen species and proinflammatory cytokine signaling in endothelial cells: effect of selenium supplementation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(6):979-986.
100. Valencia Antonio., Morán Julio. Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurons. *Free Radical Biology and Medicine*,2004, 38(9):112-115.
101. Woodhouse C. Elisa., Chuaqui F. Rodrigo., Liotta A. Lance. General Mechanisms of Metastasis. *Supplent to Cancer.*,1997,80:1529-1537.
102. W. James., M.D. Jr. What constitutes the optimal treatment environment of women with gynecologic cancer. *Gynecology Oncology*, 2003,89:1-3.



103. Yu Dihua. The role of oncogenes in drug resistance. *Citotechnology*, 1998, 27:283-292.

104. Zeeter R. Bruce. Angiogenesis and Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Med.*, 1998, 49:407-424.

105. Zhivotovsky Boris., Orrenius Sten. Apoptosis and cancer: where we are and where to go...., *Cancer Biology.*, 2003, 13:93-95.