



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

CITOTOXICIDAD Y APOPTOSIS EN LINEAS CELULARES
TUMORALES TRATADAS CON NUEVOS DERIVADOS DE
FURANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:

IVAN HUERTA MAGAÑA

MÉXICO, D.F.



2005

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

0349852



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Angelina Quintero Ruiz.
Vocal	Prof. Rocío Pozas Horcasitas
Secretario	Prof. Raquel Ortega Muñóz.
1er. Suplente	Prof. Salvador Mejía Guerrero
2do. Suplente	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología Molecular
202 Edificio B.
Departamento de Biología.
Facultad de Química.
U.N.A.M.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo receptonal.
NOMBRE: IVÁN HUERTA
MAGAÑA
FECHA: 08 11 95
FIRMA: [Firma]

Asesor del tema:

Angelina Quintero Ruiz
Dra. Angelina Quintero Ruiz.

Supervisor técnico:

[Firma]
Q.F.B. José Dolores Solano Becerra.

Sustentante:

[Firma]
Iván Huerta Magaña

AGRADEZCO A :

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser el motor Científico y Socio-cultural en torno al cual gira la vida de este gran país.

A la Facultad de Química donde me formé como universitario.

A la Dra. Angelina Quintero por haber asesorado este trabajo con entusiasmo, y por compartir su gran conocimiento, experiencia y amistad conmigo.

A las Dras. Rocío y Raquel por el tiempo quitado en las revisiones, y por las recomendaciones necesarias para la correcta elaboración de este trabajo.

Al M en C. José Solano, gracias por tu gran ayuda y por la amistad, que fueron grandes de verdad.

A toda la familia Magaña Herrejón, por su apoyo, sabios consejos y gran cariño en todo momento.

A todos mis primos hijos de la familia Magaña H. , todos y cada uno, gracias!

A mis grandes amigos, Ervin, Andrés, Miguel, Mario, y Christopher, por toda la alegría que hemos vivido juntos, y por todos los vicios que tenemos en común.

A mi amigo Rodrigo Díaz por la gran amistad que comparte conmigo y por su ayuda insustituible, felicidades por tus logros!

A Jazmin, Elizabeth y Chami por su gran y sincero cariño.

A Nora E., vamos amiga! para ya de que lllore tu corazón, pues las estrellas están brillando en el cielo, ya lo verás!

A Mayra, Miguel, Pao y Mary J. mis amigos!, gracias!

A todos los compañeros de la '99 por ser la mejor generación.

A los chavos del lab. 202: Luciano, Eli, Mauricio, Olga, Tere, Edith, Lupita y el doc. Vero, Margarita C, Cárol, Nacho, Sergio, Anel, y Miguel al que le di mi lugar. Mucha Suerte científicos!.

DEDICADA A :

A mis padres Edilh Magaña y Javier Huerta por ayudarme a entender la vida como amor, libertad, fuerza y humildad. Gracias por todo el apoyo y el cariño, sin ustedes, hasta este punto, nada, los amo.

A mi hermano, cir. gen. Omar Huerta, ejemplo de paz, fortaleza y de superación, te amaré siempre en esta y en otras vidas, sin importar el tipo de energía en el que nos transformemos.

A mis abuelos maternos y a mi tía Graciela, porque simplemente, me gusta tanto su forma de dar amor y sabiduría.

A mis abuelos paternos (Q.E.D.) por todo lo que me faltó vivir junto a ustedes, los quiero mucho.

A mi tío Rolando (Q.E.D.), A mi tío Anny, Ervin, Katia, Oscar, Karla y Sebastián, gracias por estar tan cerca de nosotros siempre, como lo hemos disfrutado y lo seguiremos haciendo!

A ti, mi amigo Andrés, por la gran ayuda para elaborar este trabajo, y por que te quiero como a un hermano.

A mi tío José Luis Magaña, canta y sonríe siempre, contárganos de tu alegría! a pesar del final del viaje.

A todas las personas que en todo el mundo realizan a diario un trabajo intelectual importante para comprender y ganarle la batalla a esta enfermedad, que se ha llevado prematuramente a tantos seres tan queridos para todos nosotros.

A los que han luchado y luchan aún hoy, por un mundo un tanto menos desigual, aquellos que han luchado con su guitarra, con su voz, en la tribuna, en la sierra, en las calles, en la prensa, en las escuelas... a todos ellos, mi corona de laureles.

A ti, por supuesto, y claro, no menos importante. Cero y Uno.

ABREVIATURAS

Abs	absorbancia
ADN	ácido desoxiribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
°C	grados centígrados
c.b.p	cuanto basta para
CO ₂	dióxido de carbono
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil)etano
D-MEM	Medio Tagle modificado de Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
D.S.	desviación estándar
ERO	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 la síntesis de ADN y la división celular.
h	horas
HCL	ácido clorhídrico
HEPES	ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazin N'-(2-etanosulfónico)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC ₅₀	representa la concentración del compuesto que produce 50% de inhibición del crecimiento de la población celular.

M	fase del ciclo celular durante la cual se dividen las células
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 ₂ 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
Detritos	restos celulares producidos durante el proceso de mantenimiento de un cultivo celular.
ATP	adenosin trifosfato (enlaces fosfato de alta energía).
cm	centímetros
pH	potencial de hidrógeno.
S.S.I	solución salina isotónica estéril
PFA	paraformaldehído
PCD	muerte celular programada
NaHCO ₃	carbonato de sodio
KH ₂ PO ₄	fosfato diácido de potasio
Na ₂ HPO ₄	fosfato monoácido de sodio
TUNEL	marcaje de extremos de ADN fragmentados con dUTP mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal.
CAT	catalsa
GPX	glutación peroxidasa
TNF	factor de necrosis tumoral
Confluencia	grado de población en un cultivo celular.
ELISA	análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas
μM	micrometros

INDICE	Página
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1 El Cáncer como enfermedad	3
2.2 El proceso de la carcinogénesis	4
2.3 Los agentes carcinógenos	5
2.4 Quimioterapia del cáncer	6
2.5 El Nifurtimox	9
2.6 Las amidas derivadas de Furano	11
2.7 El significado de la apoptosis	13
2.8 Características morfológicas en la apoptosis	14
2.9 Las Caspasas y su participación en el proceso	15
2.10 Dos vías para activar Caspasas	16
2.11 Mecanismos de regulación	18
2.12 La muerte celular por Necrosis	19
2.13 Las especies reactivas de Oxígeno (ERO)	20
2.14 Implicaciones de ERO en la apoptosis	21
2.15 Efecto de las ERO en moléculas importantes.	23
2.16 Métodos para la detección de la apoptosis.	24
2.17 Técnicas para medir viabilidad celular.	27
2.18 Técnica del MTT	27
3 Hipótesis	29
4. Objetivos	29

5. Materiales y métodos	30
5.1. Líneas Celulares empleadas	30
5.2 Soluciones utilizadas	31
5.2.1 Medio de cultivo DMEM	31
5.2.2 Solución PBS-EDTA	32
5.2.3 Solución de PBS	33
5.2.4 Medio de cultivo sin complementar	33
5.2.5 Reactivo de MTT	34
5.2.6 Solución salina isotónica estéril	34
5.2.7 Solución de paraformaldehído al 4%	35
5.2.8 Soluciones de las amidas.	35
5.3 Metodología	36
5.3.1 Descongelamiento de las líneas celulares	36
5.3.2 Mantenimiento de las líneas celulares	37
5.3.3 Propagación de las líneas celulares	37
5.3.4 Conteo celular	38
5.3.5 Exposición a los compuestos	39
5.3.6 Técnica del MTT	41
5.3.7 Montaje de células en cubreobjetos	42
5.3.8 Fijación de las muestras	43
5.3.9 Detección de apoptosis por la técnica de TUNEL	43
5.3.10 Tinción de Hemtaoxilina-Eosina.	45

6. Resultados.	47
6.1 Resultados de citotoxicidad.	47
6.2 Detección de apoptosis.	55
6.3 Descripción de la morfología celular.	60
7. Discusión.	63
8. Conclusiones.	68
9. Bibliografía.	69

1. Resumen.

El cáncer es una enfermedad que tiene una importancia fundamental en el ámbito de la salud en nuestro país y en el resto del mundo. Es una enfermedad de carácter multifactorial; puede ser resultado de la alteración de oncogenes y de genes supresores de tumores, lo que lleva a la transformación de células normales a células que proliferan sin control, las cuales pueden invadir otros órganos y causar así metástasis.

Existen métodos quirúrgicos y no quirúrgicos entre los cuales se encuentra la quimioterapia, cuyo objetivo es atacar selectivamente el proceso metabólico implicado en la condición patológica, sin embargo durante este tratamiento se presentan diversas barreras como son: heterogeneidad biológica, resistencia de las células malignas a los agentes convencionales contra el cáncer y daño al tejido sano. Por esto la búsqueda de nuevos compuestos citotóxicos es de gran relevancia en el ámbito de la investigación contra esta enfermedad.

El presente trabajo tiene como objetivo analizar la actividad citotóxica de un grupo de seis compuestos que son amidas alfa-beta insaturadas derivadas del furano, las cuales fueron proporcionadas previamente por Pozas-Horcasitas y col²⁸; como moléculas análogas a una molécula líder llamada comercialmente Nifurtimox, seleccionada especialmente por sus características de citotoxicidad en el *Trypanosoma Cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Los ensayos citotóxicos se llevarán al cabo en líneas celulares tumorales en las cuales se probarán los nuevos compuestos para determinar la IC₅₀. Posteriormente, se utilizará el compuesto mas activo para determinar la fragmentación del ADN y el tipo de muerte celular que producen estos compuestos en las células utilizadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 EL CANCER COMO ENFERMEDAD

El cáncer constituye uno de los principales problemas de salud en todo el mundo, y es una de las principales causas de mortalidad tanto en la infancia como en la edad adulta⁸.

En la actualidad se reconoce al cáncer como una anomalía genética en el ámbito celular, que implica la mutación de un grupo de genes. Estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y la pérdida o inactivación de estos genes da lugar a una división celular descontrolada y a la formación de tumores. Las mutaciones que alteran el genoma o la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres. En algunos casos tales mutaciones inciden en la línea germinal y se heredan⁸.

El cáncer se origina a partir de la proliferación descontrolada y la extensión de clones de las células transformadas. El crecimiento de los tumores malignos está determinado en gran medida por la capacidad proliferativa de las células tumorales, por su capacidad de invadir los tejidos del huésped y desarrollar metástasis en sitios distantes⁹.

El cáncer es un problema de salud mayor en los Estados Unidos y en otros países desarrollados. Actualmente una de cada cuatro muertes en los Estados Unidos es debida a dicho padecimiento². En datos publicados en el año 2003 se menciona

que para la población derechohabiente del IMSS en todo el país, los tumores malignos representan la segunda causa de muerte¹.

2.2 EL PROCESO DE LA CARCINOGENESIS

El proceso carcinogénico puede ser dividido en dos secuencias: la transformación neoplásica y el desarrollo neoplásico^{12,11,14}.

La secuencia de eventos iniciales que se presentan en el proceso de carcinogénesis, es llamada *iniciación*; la cual consiste en la transformación de una célula normal a una célula neoplásica por medio del desarrollo de defectos genéticos. Las transformaciones en estas células son consecuencia de mutaciones que resultan de la alteración del ADN que no es corregido por los procesos de reparación. Las mutaciones críticas que se ven involucradas en el proceso de transformación ocurren en: los genes que controlan el crecimiento, en los protooncogenes, en los genes supresores de tumores, y en los genes reguladores de los genes supresores de tumores, lo que resulta en una pérdida del control de la proliferación^{12,14,15}.

En la segunda secuencia de la carcinogénesis, la célula neoplásica prolifera de manera descontrolada hasta los tejidos circundantes, como si lograra una expansión clonal, que eventualmente resulta en la formación de una neoplasia benigna; dicha expansión clonal puede ser resultado de una disminución del proceso de apoptosis. Se piensa que una proliferación celular sostenida provoca que el comportamiento de la neoplasia benigna se encamine hacia la formación de una neoplasia maligna¹².

2.3 LOS AGENTES CARCINOGENOS

Un gran número de agentes causan daños genéticos e inducen la transformación neoplásica de células, entre los que se encuentran, los carcinógenos químicos, la energía radiante y los virus oncogénicos.

Las sustancias químicas que inician la carcinogénesis son de estructura extremadamente diversa e incluyen tanto a productos naturales como sintéticos. En general se pueden clasificar de la manera siguiente: 1) compuestos de acción directa, que no requieren transformación química para su carcinogenicidad y, 2) compuestos de acción indirecta o procarcinógenos, que requieren la conversión metabólica *in vivo* para producir carcinógenos finales capaces de transformar las células.

Los carcinógenos genotóxicos son aquellos que deben su carcinogenicidad al hecho de que forman aductos con el ADN, lo que constituye la base para la transformación neoplásica. Este tipo de carcinógenos tienen grupos electrofílicos reactivos en su estructura, o pueden ser biotransformados a especies electrofílicas reactivas dentro de la célula¹². Algunos ejemplos son: las mostazas nitrogenadas, el óxido de etileno, los hidrocarburos policíclicos aromáticos: como el 1-benzo(a)pireno, Las nitrosaminas como: la dietilnitrosamina, el benceno; productos naturales como: Aflatoxina B₁, Aflatoxina G₁, y los alcaloides de la pirrolizidina, entre otros más.

Los carcinógenos epigenéticos, también llamados no genotóxicos, son aquellos que inducen desarrollo de tumores al menos en roedores, sin que tengan una interacción directa con el ADN. Carecen de la estructura molecular requerida para formar electrófilos ; sin embargo, su actividad está relacionada con la regulación indirecta de la expresión de ADN, por lo que permiten que las células inestables persistan y proliferen y, posiblemente alcancen la transformación maligna en algún momento¹⁰. Algunos ejemplos son: el DDT, el fenobarbital, los bifenilos policlorinados y policromados, la sacarina sódica, la ciclosporina, el omeprazol, el asbesto y el dioxano; metales como: el arsénico, cadmio, cromo IV y níquel¹²

2.4 QUIMIOTERAPIA EN EL CANCER

La estrategia de la terapéutica oncológica moderna es multidisciplinaria. La cirugía es el tratamiento más utilizado y curativo, pero como consecuencia de los grandes avances en la radioterapia y la quimioterapia, la cirugía ha adquirido más elementos de apoyo porque cuenta con tratamientos complementarios; siendo en muchas situaciones, las asociaciones terapéuticas cirugía-radioterapia-quimioterapia, tanto o más efectivas que la cirugía sola. El riesgo-beneficio de cualquier acto terapéutico debe de considerar, en primer lugar, el estado físico del paciente.

Los agentes antineoplásicos se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción intracelular^{5-7,9,16}. A continuación se presenta la clasificación, con algunos ejemplos.

a) Agentes alquilantes:

Los agentes de alquilación utilizados en la quimioterapia comprenden un grupo heterogéneo de sustancias que tienen la propiedad común de donar, en situaciones fisiológicas, grupos alquilo a macromoléculas biológicamente vitales como el ADN. Los efectos farmacológicos más importantes de estos agentes son los que alteran los mecanismos fundamentales que intervienen en la proliferación celular, en particular la síntesis de ADN y la división celular. Algunos ejemplos de estos son: las mostazas nitrogenadas: Ciclofosfamida, ifosfamida, y el clorambucil^{58.7.6}.

b) Antimetabolitos.

Son sustancias similares a los metabolitos naturales, pero en los que se han introducido uno o dos cambios en su estructura química. La célula los utiliza indistintamente; pero el antimetabolito induce la denominada síntesis letal de bases purínicas y pirimidínicas. Algunos ejemplos son: el metotrexato, la 6-mercaptopurina y la 5- fluorouridina.^{58.7.6}

c) Inhibidores de la topoisomerasa II.

Estos agentes no detienen las células en mitosis, sino que forman un complejo ternario con la topoisomerasa I y el ADN; Este complejo ocasiona ruptura en el ADN. Las células que están en las fases S y G₂ son más sensibles a estos fármacos. Como ejemplos de estos compuestos tenemos al etopósido y al tenipósido.^{58.7.6}

d) antibióticos antitumorales

Son productos de origen microbiano, que inhiben el crecimiento tumoral, por lo general provienen de bacterias del género *Streptomyces*. Este grupo de fármacos tiene la propiedad de intercalarse en el ADN y así bloquear la síntesis de proteínas y ARN, entre los que se encuentran: la mitomicina C, actinomicina D, y las bleomicinas.^{56, 7, 6}

e) inhibidores de la mitosis:

Diversos alcaloides derivados de plantas tienen actividad antineoplásica; entre ellos tenemos a los derivados de la Vinca, y al Taxol y sus derivados. Dentro del primer grupo, dos alcaloides tienen fundamental importancia: la vincristina y la vinblastina, obtenidos de la Vinca (*vinca rosea*), que se han convertido en agentes clínicos importantes para tratar leucemias, linfomas y cánceres testiculares. Sus actividades biológicas se explican por su capacidad de ligarse específicamente a la tubulina y bloquear la propiedad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos. Por su parte, el paclitaxel, que recibe también el nombre de taxol, posee efectos farmacológicos peculiares como inhibidor de la mitosis, pero difiere de los alcaloides de la vinca en que estimula la formación de microtúbulos, y no la inhibe; se liga específicamente a las subunidades β -tubulina de los microtúbulos, y así, antagoniza el desensamble de esta proteína citoesquelética; por lo que en las células tratadas con este compuesto se observan haces de microtúbulos y estructuras aberrantes. En consecuencia el ciclo celular se detiene en mitosis^{16, 7}

f) agentes hormonales

El efecto de la hormonoterapia se produce a partir de diversos mecanismos, como impedir o reducir la síntesis de hormonas que favorecen el crecimiento tumoral, antagonizar sus efectos, interferir su acción sobre la célula diana e interactuar en los procesos de regulación interhormonal. Como ejemplos de estos se reportan los siguientes: progestágenos, antiestrógenos, y antiprolactinémicos^{58, 7, 6}.

2.5 EL NIFURTIMOX

En la actualidad son conocidos dos fármacos con actividad clínica reconocida para el tratamiento de la enfermedad de Chagas producida por el *Trypanosoma cruzi*, los cuales son el Nifurtimox y Benznidazol¹⁷. Estos compuestos muestran respuesta clínica insatisfactoria, y varios efectos adversos; por lo que siguen siendo investigados estos y sus derivados²⁵. Muchos autores han reportado que *T. Cruzi* es particularmente sensible a los compuestos que producen radicales libres, debido a que carece de las enzimas Catalasa y Glutación peroxidasa, y han propuesto que el principal mecanismo de acción del nifurtimox es la producción intracelular de anión superóxido²⁷; además, es bien conocido que el ciclo redox de compuestos nitro, especialmente el Nifurtimox y el Benznidazol genera nitroaniones y radicales libres de oxígeno²². Antes de 1975 el mecanismo de acción de los nitrofuranos era desconocido, pero en el año de 1979 Docampo y Stoppani, propusieron que el Nifurtimox induce un incremento en la velocidad respiratoria y una liberación de peróxido de hidrógeno en el protozooario, debido a que el sustituyente nitro sobre el anillo de furano de la molécula, puede

reaccionar con reductores biológicos como el NADP(H)^{20,28}, como lo muestra el mecanismo siguiente:

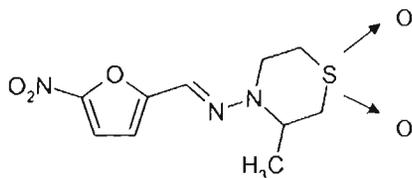


Figura 1.- Estructura química del nifurtimox

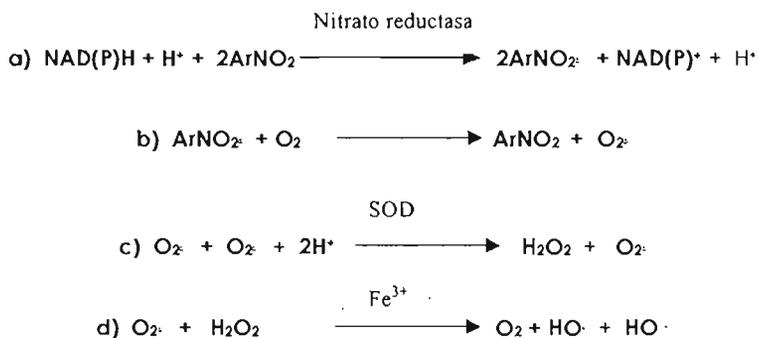


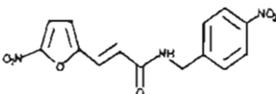
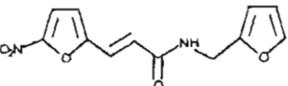
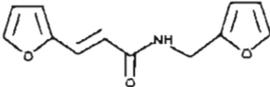
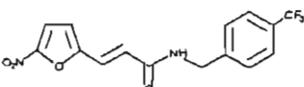
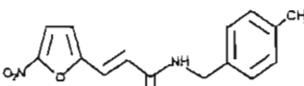
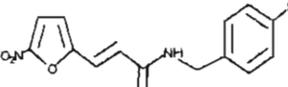
Figura 2.- Mecanismo de acción del Nifurtimox, en el que se observa la generación de derivados tóxicos de oxígeno.

- a) Reducción del grupo nitro de los nitrofuranos por NADP(H) como donador de electrones.
- b) El ión radical se oxida para formar el anión radical superóxido.
- c) Producción de peróxido de hidrógeno en presencia de la Superóxido dismutasa.
- d) A partir de especies reactivas involucradas se forma el radical hidroxilo altamente reactivo^{20,27-31}.

2.6 LAS AMIDAS DERIVADAS DE FURANO

Con base en lo mencionado anteriormente, a partir del año 2001 Pozas Horcasitas y colaboradores, iniciaron la síntesis de una serie de amidas α,β -insaturadas derivadas del furano para ser utilizadas como quimioterapia alternativa, tomando como molécula líder al Nifurtimox^{28,29,30,31,32,33}. En este sentido, aprovechando la actividad biológica de este compuesto en el presente trabajo se probaron seis de estos derivados (tabla.1) con el objetivo de investigar dicha actividad en líneas celulares tumorales de origen humano. Con relación a lo anterior Baranda (2004)³³ encontró que un grupo de compuestos pertenecientes a esta serie de amidas α,β -insaturadas derivadas de furano presentaron actividad citotóxica importante sobre las mismas líneas celulares utilizadas en este trabajo, y propuso una muerte celular apoptótica como respuesta a la exposición de dos de los compuestos. La apoptosis en el trabajo de Baranda fue demostrada por citometría de flujo, ya que se presentó un aumento en la población de células en la fase sub-G1, posterior a un arresto transitorio en la fase de síntesis (S) en el ciclo celular³³.

Tabla 1. Amidas α,β insaturadas derivadas de furano.

Compuesto	Estructura	Nombre
A		N-(4-nitrobenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida
B		N-furfuril-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida
C		N-furfuril-3-(2-furil)-2-(E)-propenamida
D		N-(4-trifluorometilbenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida
E		N-(4-metilbenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida
F		N-(4-fluorobenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida

el nombre del compuesto designado desde A hasta F, es el nombre que se maneja en el resto del texto²⁸.

2.7 EL SIGNIFICADO DE LA APOPTOSIS

El término apoptosis que fue introducido por vez primera en una publicación de Kerr y Willie en 1972, se ha empleado para describir los procesos morfológicos que conducen a un tipo de autodestrucción celular controlada. La palabra apoptosis es de origen griego y significa “lo que cae o lo que se desprende”, en analogía a las hojas y pétalos que se desprenden de los árboles^{52,50,56}.

Esta analogía hace un especial énfasis a que la muerte en los seres vivos es parte integral y necesaria de los ciclos de vida de los organismos^{50,56}. Se habla de un programa controlado de muerte celular debido a que la célula tiene una participación activa y un control de tipo genético en su propia muerte celular⁵². Los procesos apoptóticos tienen en general, un significado biológico ampliamente conocido. Por ejemplo, se encuentran involucrados en el funcionamiento del sistema inmune, en la eliminación de células con defectos o que resulten dañinas, y que son esenciales para el desarrollo embrionario y para la homeostasis de los tejidos en los organismos multicelulares^{57,56,53}. De esta manera una disfunción o regulación ineficiente del programa apoptótico está implicado en una variedad de condiciones patológicas, ya sean degenerativas, por infección o de autoinmunidad^{46,49,52}.

2.8 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS CELULARES EN LA APOPTOSIS

Las células apoptóticas atraviesan por una serie de cambios morfológicos que ya han sido bien descritos por varios autores^{46,47,52,43}. En la fase inicial la célula individual contenida en un tejido puede perder el contacto con células vecinas, el núcleo se condensa, formando cápsulas de cromatina en su periferia o incluso puede ser fragmentado, la célula se contrae debido a la pérdida de volumen citoplasmático, mientras que el resto de los organelos pueden permanecer intactos. En la siguiente fase la membrana celular presenta perturbaciones morfológicas que conducen a la fragmentación; la célula queda fragmentada en los llamados cuerpos apoptóticos que contienen restos de citoplasma, de cromatina y de los organelos dentro de compartimientos de membrana. Finalmente las células vecinas y macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos y los degradan completamente dentro de los fagosomas^{47,46, 55,52}

La apoptosis es un programa de muerte celular altamente regulado y eficiente que requiere de la interacción de múltiples factores, los componentes de la red de señalización apoptótica se encuentran genéticamente codificados, y listos para ser activados por un estímulo que induzca hacia la muerte celular. El proceso puede ser iniciado por estímulos provenientes del interior o del exterior de la célula entre los que se encuentran: la unión de ligandos a receptores de la superficie celular, daño al ADN como resultado de defectos en los mecanismos de reparación, tratamiento por fármacos citotóxicos, irradiación o la supresión de factores de supervivencia⁵⁶.

2.9 LAS CASPASAS Y SU PARTICIPACION EN EL PROCESO

La apoptosis en células de mamíferos es mediada por una familia de cisteín proteasas llamadas caspasas, del inglés (cysteine-dependent aspartate-specific proteases). La mayoría de los cambios morfológicos característicos que han sido observados en el programa de apoptosis son causados por este grupo de cisteín-proteasas y son activadas específicamente en las células apoptóticas. Para mantener el programa de muerte bajo control, las caspasas son inicialmente expresadas como precursores inactivos llamados "procaspasas"⁴³. Dentro de este grupo las caspasas presentan semejanzas estructurales entre sí y constituyen una larga familia de proteínas, que han sido altamente conservadas en el paso de la evolución, ya que se pueden encontrar desde el ser humano hasta los insectos y nemátodos donde se han encontrado diversos homólogos de ellas. Hasta el año 2000 se habían identificado casi una docena de ellas en los humanos, y dos tercios de ellas habían sido sugeridas como funcionales, en el programa de muerte celular apoptótico^{51,52}.

Todas las caspasas conocidas poseen un sitio activo de un residuo de cisteína, y activan a sus sustratos específicamente después de los residuos de ácido aspártico (Asp)⁵¹. Inicialmente son sintetizadas como zimógenos inactivos llamados procaspasas, que, cercano a su extremo N-terminal, poseen un prodominio seguido de una subunidad corta y una larga, separadas por un péptido de unión. En su maduración las procaspasas son proteolíticamente procesadas entre las dos subunidades y de ésta manera se produce una caspasa activa que es un tetraheterodímero formado por dos unidades cortas y dos largas^{56,51,43}.

Las caspasas proapoptóticas pueden dividirse en dos grupos. El grupo de caspasas iniciadoras que incluye a las procaspasas 2, 8, 9 y 10, y el grupo de las caspasas ejecutantes del programa de muerte que incluyen a las procaspasas 3, 6 y 7. Las caspasas ejecutantes del programa de muerte poseen solo prodominios cortos, mientras que las caspasas iniciadoras poseen prodominios largos. En el caso de las procaspasas 8 y 10 contienen dominios efectores de muerte (DED) o los dominios de reclutamiento de caspasas (CARD) como en el caso de las procaspasas 9 y 2⁵⁶.

2.10 DOS VÍAS PARA ACTIVAR LAS CASPASAS

En general existen dos vías por las cuales la activación de las caspasas se puede presentar: la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis⁴³

La vía extrínseca es activada por la unión de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-RI, TNF-RII y FAS/CD95) situados en la superficie celular con ligandos tales como: el factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando de FAS (FASL), respectivamente, lo cual va a inducir en el citoplasma la formación del complejo de señalización de muerte inducida (DISC). Este complejo, a su vez, recluta moléculas de procaspasas 8 y por la proximidad que mantienen estos zimógenos, se asume como teoría, que se activan por autoproteólisis. Posteriormente las caspasas-8 ya activas, pueden activar a las caspasas efectoras que activarán luego sustratos proteicos que van a causar la muerte celular^{51,56}. Posteriormente, el miembro Bid de la Familia de proteínas Bcl-2 (ver sección 2.11) puede amplificar la señalización de la apoptosis al ser activado por caspasa-8, y luego translocado hacia la mitocondria, para causar la liberación de factores

proapoptóticos mitocondriales hacia el citosol, que luego podrán activar a las caspasas efectoras (-3, -6 y -7)⁵¹.

Además de amplificar y mediar las vías extrínsecas de la apoptosis, la mitocondria también tiene un papel central en la integración y la propagación de las señales de muerte originadas en el interior de la célula, tales como: daño en ADN, hipoxia, estrés oxidativo, o ausencia de nutrientes³⁸. La mayoría de las condiciones que pueden inducir la apoptosis se involucran hacia la disminución del potencial de la membrana interna mitocondrial ($\Delta\psi$) y de la permeabilidad de transición (PT). Con esto, se da un incremento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna hacia los solutos con un peso molecular aproximado y por debajo de los 1.5 kDa; al mismo tiempo, se produce un hinchamiento mitocondrial por ósmosis debido a un transporte de agua hacia la matriz mitocondrial, lo que resulta en la ruptura de la membrana mitocondrial externa, que causa finalmente, la liberación de las proteínas proapoptóticas hacia el citoplasma^{56,43}. Por lo recién mencionado, se presenta la liberación de citocromo C, que se une 1 a 1 con 7 unidades de la proteína Apaf-1 (factor activador de proteasas apoptóticas-1), dando origen así a una estructura heptamérica llamada apoptosoma. La procaspasa -9 puede unirse a ésta estructura y activarse por medio de la formación de dímeros. Una vez que esta caspasa iniciadora ha sido activada, puede posteriormente, activar proteolíticamente al resto de las caspasas efectoras: caspasas (-3, -6 y -7), las cuales pueden activar a diferentes sustratos proteicos o a otras caspasas, para amplificar y mediar las señales que darán origen a la ejecución del programa de muerte, lo que se reflejará en todos los cambios morfológicos y eventos bioquímicos que se reportan como observados y estudiados en el programa de muerte por apoptosis⁵⁶.

2.11 MECANISMOS DE REGULACION EN LA APOPTOSIS

Bcl-2 es un oncogén que se encuentra frecuentemente ligado al locus de una inmunoglobulina, cuando se presenta la traslocación cromosomal t(14:18), en el linfoma folicular de células B, de ahí su nombre. Fue el primer ejemplo de un oncogén que inhibía la muerte celular y además promovía la proliferación. Se han identificado una serie de homólogos de Bcl-2, y en esta familia de proteínas, se ha encontrado la presencia de secuencias conservadas conocidas como: dominios de homología de Bcl-2 (de BH1 a BH4)^{56.51}.

Los miembros de la familia Bcl-2, pueden dividirse dentro de dos grupos de acuerdo a su función y las similitudes estructurales, los miembros antiapoptóticos y los proapoptóticos. Dentro de la célula, los miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (*Bax*, *Bak* y *Bok*) y las proteínas con el dominio de BH₃ exclusivo (*Noxa*, *PUMA*, *Bim*, *Bmf*, *Bad*, *Bid*) son antagonizados por los miembros antiapoptóticos de Bcl-2 (*Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-w*, *A₁*). En respuesta a un estímulo apoptótico los miembros con dominio BH₃ exclusivo son activados por regulación positiva transcripcional, relocalización subcelular, desfosforilación o proteólisis. Luego, estas proteínas se unen a los miembros antiapoptóticos Bcl-2 para que no impidan la actividad de las miembros proapoptóticos (*Bax* y *Bak*) a nivel mitocondrial. De esta forma los miembros proapoptóticos, pueden oligomerizarse e insertarse en la membrana mitocondrial, donde pueden formar canales, ya sea por ellos mismos, o por la asociación con el poro de permeabilidad de transición (PTP). En consecuencia se liberan los factores proapoptóticos del interior de la mitocondria,

para que luego se presente, la cascada de activación de caspasas mencionada anteriormente^{56,47,40}.

Como mecanismo de refuerzo en el proceso, son liberadas de la mitocondria los factores proapoptóticos (Smac/Diablo y Htra2/Omi) que remueven a los factores inhibidores de proteínas de apoptosis (IAP's) para asegurar la continuidad hacia la muerte celular⁵⁷.

Además de la liberación de los factores mitocondriales, la disminución de ($\Delta\psi$) y de (PT) provocan un desequilibrio bioquímico en la célula: la síntesis de ATP se detiene, el NADH, el NADPH y el Glutatión son oxidados, y por esto las ERO son altamente generadas. Los niveles incrementados de ERO causan directamente la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y así, nuevamente se presenta la caída de el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) como mecanismo de retroalimentación positivo^{37,88}.

2.12 LA MUERTE CELULAR EN LA NECROSIS.

Este tipo de muerte celular es resultado de procesos patofisiológicos como la infección, la inflamación o la isquemia⁴³. La necrosis es el proceso que se da cuando una célula presenta daño severo y pierde, entre otras cosas, la integridad de su membrana, que le llevará a muerte por lisis celular. En estas circunstancias se libera el contenido intracelular, lo que *in vivo* favorece la aparición de procesos inflamatorios. Al igual que durante la apoptosis, también se presenta la agregación de la cromatina nuclear, que sin embargo es menos densa y menos homogénea que lo que se puede observar durante la muerte por apoptosis. A diferencia de la apoptosis durante la necrosis los organelos se hinchan y el volumen celular aumenta considerablemente. Ninguno de estos cambios está determinado

genéticamente y resulta, más bien, de la pérdida de sincronización funcional entre los procesos bioquímicos y las estructuras macromoleculares que constituyen a la célula. Durante la muerte por necrosis el ADN se degrada por acción de endonucleasas y exonucleasas, y los nucleosomas parecen perder la integridad ya que al separarse por electroforesis en geles de agarosa, se observa un barrido sin que aparezcan las bandas discretas. Esto refleja que en la muerte por necrosis el ADN se corta en fragmentos de una gran variedad de tamaños. En algunos trabajos también se relaciona a este tipo de muerte celular con el daño oxidativo^{52,57}.

2.13 LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de todos los organismos aeróbicos, ya que su consumo está acoplado a la producción de energía mediante la síntesis de ATP. Este proceso se conoce como fosforilación oxidativa, en el cual el oxígeno sirve como aceptor final de electrones dentro de un complejo enzimático mitocondrial, que le transfiere electrones y lo reduce, para formar agua. Como consecuencia de esta transferencia de electrones se producen metabolitos reactivos derivados de oxígeno dentro de los que se incluyen: el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el oxígeno singulete (1O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos metabolitos parcialmente reducidos son llamados "Especies Reactivas de Oxígeno" (ERO), debido a las reactividades altas que poseen en relación al oxígeno molecular^{71,72,76}.

Las ERO derivadas de la mitocondria y de otras fuentes celulares, han sido consideradas como tóxicas para el metabolismo, con potencial para causar daño celular en lípidos, proteínas y ADN. Para lograr una protección contra los efectos de ERO, las células poseen varias enzimas antioxidantes tales como: la Superóxido Dismutasa (reduce O_2^- a H_2O_2), la Catalasa y la Peroxidasa, que remueven H_2O_2 para generar agua, y la glutatión peroxidasa (GPx), que puede remover productos de la peroxidación, formados en la reacción de lípidos con ERO⁷³. En este sentido el estrés oxidativo puede ser definido como un desbalance entre la producción de especies oxidantes y la capacidad antioxidante de una célula, para prevenir daño celular por oxidación⁷⁶.

2.14 IMPLICACIONES DE LAS ERO EN LA APOPTOSIS

La apoptosis como anteriormente se había mencionado puede iniciarse por una variedad de estímulos entre los que se incluyen: la hipertermia, la supresión del factores de crecimiento, hormonas, agentes oxidantes, la radiación ionizante y múltiples agentes quimioterapéuticos⁷¹. Algunas líneas de investigación dan evidencia de que el estrés oxidativo es mediador en el proceso de apoptosis^{79,43,57}. Se ha propuesto que actúa por un decremento del nivel intracelular de Glutatión -el más eficiente regulador del estado redox intracelular- o por incremento mismo de ERO. El H_2O_2 en dosis bajas induce la apoptosis por la vía de producción de radicales HO \cdot y la alteración de la vía oxidante/antioxidante dentro de la célula^{71,72}.

En el año del 2002 Nakawaga observó que el trióxido de arsénico indujo apoptosis a través de estrés oxidativo en líneas celulares de cáncer de colon; además observó que la apoptosis fue llevada a cabo por la activación de la caspasa- 3 sin

que las células sometidas a tratamiento perdieran su potencial de membrana mitocondrial aún con la sobreexpresión de proteínas Bcl-2 ya que esta sobreexpresión inhibe la apoptosis en respuesta a varios estímulos, citotóxicos^{56,79}. Estos resultados sugirieron que la apoptosis fue ejecutada bajo condiciones de sobreproducción de ERO por medio de la activación de caspasa 3 sin intervención de la vía mitocondrial⁷⁹. Se ha observado también que el quinifuryl, un antiséptico usado en la cirugía, que posee el sustituyente 5-nitrofurano en su molécula; presentó efectos citotóxicos en la línea celular K562 de eritroleucemia humana por mecanismos de producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno durante el metabolismo de este compuesto bajo condiciones de iluminación o de oscuridad²⁴.

La observación de que varios tipos de cáncer presentan una posible relación entre actividades disminuidas de enzimas antioxidantes y un incremento en los niveles de bases hidroxiladas de ADN por daño oxidativo apoya el hecho de que se encuentran las ERO incrementadas en células tumorales. De hecho los niveles de enzimas antioxidantes en linfocitos de leucemia linfoblástica aguda son más bajos que en células normales control^{71,72}. Existe un grupo de líneas celulares que han sido fuertemente relacionadas con un desequilibrio en el estado redox intracelular^{71,72}. A pesar de algunas excepciones, los niveles basales de defensas antioxidantes están frecuentemente disminuidos en las células tumorales; por ejemplo las actividades de la SOD que contiene cobre/zinc y manganeso son relativamente más bajas en algunos tipos de células tumorales, cuando son comparadas con las células normales de las que derivaron⁷³. A pesar de esto, aún hay pocos estudios que han comparado las respuestas al estrés oxidativo entre células normales y células tumorales de una manera más sistemática^{71,72,73}.

2.15 EFECTO DE LAS ERO EN LAS BIOMOLÉCULAS.

EFECTO SOBRE LOS ACIDOS NUCLEICOS

Los radicales libres dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con las desoxirribosas. El daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que resultan en carcinogénesis, apoptosis y enfermedades hereditarias; se han detectado más de veinte tipos de modificaciones estructurales a las bases. Se ha observado que en presencia de ERO existe la fragmentación del ADN y aparecen fragmentos internucleosomales³⁴.

OXIDACION DE LIPIDOS POR EROS

El efecto más importante de las ERO sobre los lípidos es la reacción de lipoperoxidación; se genera este tipo de reacción cuando se da el contacto de los lípidos con cualquiera de las ERO. En esta reacción el radical libre puede oxidar una cadena lipídica insaturada, dando así origen a un lípido hidroperóxido y a un radical alquilo; el alquilo puede reaccionar con el oxígeno para generar nuevamente la especie inicial, proceso que constituye una reacción cíclica. La lipoperoxidación puede causar alteración en la estructura de la membrana, en su fluidez y daño en su integridad. En esta reacción se pueden formar especies como el malonildialdehído y el 4-hidroxi-3-nonenal; ambas especies pueden interactuar con componentes celulares, como las proteínas y el ADN^{72,85}

OXIDACION DE PROTEINAS POR EROS

Uno de los aspectos más importantes en las condiciones de estrés oxidativo es el daño de las ERO en las proteínas celulares debido a que se pueden interrumpir las vías metabólicas, se puede dar la pérdida de la actividad catalítica y se puede presentar el daño en la integridad de las proteínas estructurales. Los efectos que causan los radicales libres sobre las proteínas son generalmente: la modificación por la oxidación de los residuos de cisteína, la formación de puentes disulfuro intramoleculares, la dimerización de proteínas por puentes disulfuro intermoleculares, rompimiento del enlace peptídico y la oxidación por reacciones tipo Fenton catalizadas por metales^{84,76}.

2.16 METODOS PARA LA DETECCION DE LA APOPTOSIS.

La detección de la apoptosis ha adquirido gran importancia en el área de la investigación del cáncer, ya que puede ser útil para conocer los mecanismo de acción de fármacos, mecanismos asociados a la naturaleza de la enfermedad y efectividad de los tratamientos. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para detectar la apoptosis están, la detección de la degradación de ADN, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas³⁹. Los métodos utilizados principalmente son:

1) Cambios morfológicos presentes en la MCP (muerte celular programada).

Una de las primeras manifestaciones morfológicas de la presencia de muerte celular por apoptosis es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la organización de la membrana citoplasmática, la aparición de condensación de la cromatina, la aparición de cuerpos apoptóticos y alteraciones en la mitocondria. Para determinar estos cambios en la célula se puede hacer uso de la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia) o la microscopía electrónica³⁹.

2) Detección de la degradación del ADN.

La degradación del ADN de forma específica entre nucleosomas, se asocia con la apoptosis. Al realizar un corrimiento electroforético de extractos de ADN es posible observar un patrón característico de ADN en escalera, el cual contiene fragmentos discretos y múltiplos del tamaño de un nucleosoma, a los cuales se les llama *ladder of DNA*^{39,36}, como una analogía a un patrón similar a peldaños de una escalera.

3) Detección de degradación de ADN en células individuales por medio del marcaje del ADN.

Uno de los métodos más utilizados es el de marcaje de ADN de hebra sencilla por medio de una transferencia terminal, que adiciona nucleótidos marcados con fluoresceína. Este método se conoce como TUNEL (transferase-mediated dUTP nick end-labeling), y se puede utilizar para la detección por citometría de flujo y para la microscopía. Esta técnica Permite detectar la presencia de fragmentación

en células individuales. Durante los estados tardíos de la necrosis también se presenta la degradación de ADN, aunque no con el patrón internucleosomal presente en la apoptosis, lo que no es posible distinguir con éste método, así que se sugiere la evaluación morfológica. La técnica de TUNEL tienen la especificidad de marcar preferencialmente fragmentos de ADN inducidos por apoptosis que aquellos producidos por necrosis^{36,39}.

4) Detección de activación de caspasas.

La determinación de la activación de caspasas tiene gran importancia para la detección de la apoptosis. La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano y presenta la ventaja de tener una alta correlación con la inducción de la apoptosis, por lo que elimina la incertidumbre presente con otros marcadores³⁹.

5) Evaluación de la simetría de la membrana celular.

Un evento temprano presente en la apoptosis es la pérdida de la simetría de la membrana citoplasmática. La fosfatidil serina es una molécula que se encuentra en el interior de la célula pero cuando la célula entra en apoptosis, la fosfatidil serina se expone hacia el exterior. Por eso se han desarrollado métodos como la tinción con Anexina V, que es un compuesto que no se difunde hacia el interior, y que ha mostrado afinidad a la fosfatidilserina. Esta técnica se recomienda para estudios *in vitro*³⁹

2.17 TECNICAS PARA MEDIR LA VIABILIDAD CELULAR.

La sensibilidad o resistencia que puedan presentar las líneas celulares de cáncer frente a la exposición de fármacos citotóxicos son factores importantes en la planeación de los tratamientos; por lo tanto, encontrar la potencia de nuevos y ya conocidos agentes antineoplásicos es un tema y una actividad de uso cotidiano en el campo de la investigación sobre el cáncer^{62,63}.

Muchos ensayos biológicos requieren de la determinación células sobrevivientes o en proliferación, lo que se puede lograr por varios métodos, ya sea: el conteo de células que incluyen o excluyen una tinción en el medio, la determinación de proteínas marcadas con (⁵¹Cr) después de la lisis celular y el análisis de la incorporación de nucleótidos marcados con radioactividad Timidina [³H] o Iododesoxiuridina [¹²⁵I] durante la proliferación celular^{65,67}.

2.18 TECNICA DEL MTT

La técnica del MTT fue descrita por Mossman en 1983⁶⁵, y representa una forma rápida, sensible y fácil de medir la viabilidad celular después de tiempos de exposición a compuestos con potencial citotóxico. Ha sido modificado por varios investigadores desde que, por primera vez, fue desarrollado por Mossman . Se basa en la reducción (fig. 4) metabólica de la sal de color amarillo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (fig.3) por deshidrogenasas mitocondriales en las células viables dando como producto cristales de color púrpura (formazán del MTT) insolubles en agua. De este modo, la absorción en la región del visible del formazán disuelto, se relaciona directamente con la cantidad

de células vivas e intactas. Los compuestos citotóxicos son capaces de dañar o destruir a las células, por esto se puede dar la disminución en la reducción del MTT a formazán.⁶²⁻⁶⁷ Datos recientes sugieren que enzimas citosólicas y microsomales también contribuyen a la reducción del MTT⁶²⁻⁶⁷.

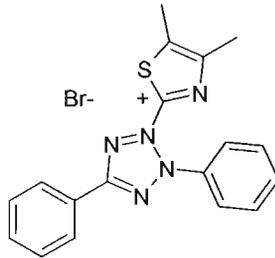


figura 3. estructura química del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

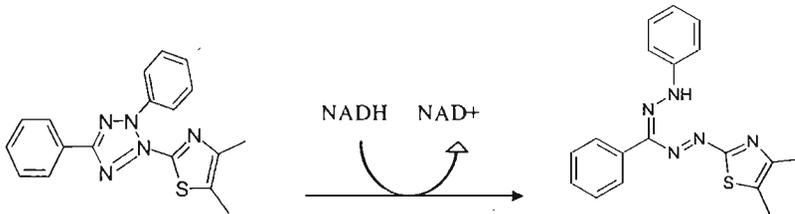


figura 4. la reducción del anillo de tetrazolio del MTT.

3. HIPOTESIS

Se ha observado que las amidas α,β -insaturadas derivadas del furano presentan actividad citotóxica en parásitos unicelulares y en ciertas líneas celulares tumorales. Por lo tanto, en este trabajo se espera observar actividad citotóxica en las líneas celulares tratadas con este grupo de compuestos y la posible muerte de tipo apoptótica.

4. OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico de seis amidas α,β -insaturadas derivadas del furano en líneas celulares tumorales, por medio de ensayos *in vitro*.

- OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) que producen las amidas α,β -insaturadas derivadas del furano en las diferentes líneas celulares tumorales.

Determinar el tipo de muerte celular, utilizando el ensayo de TUNEL.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 LINEAS CELULARES EMPLEADAS

El cultivo de células es una herramienta con amplia utilidad para la investigación de la biología celular, que nos permite examinar la unidad básica de la vida después de probar infinidad de variables experimentales, una vez que conseguimos mantener las células vivas después de largos períodos de tiempo, podremos comenzar a manipularlas con el objetivo de dar respuesta a las preguntas planteadas. Para asegurar que los resultados obtenidos tienen alguna validez las condiciones de cultivo deberán de ser las óptimas. Existen líneas celulares de diverso origen y para la investigación se van a elegir según las necesidades que se tengan. En el presente trabajo se utilizaron líneas celulares tumorales de origen humano con diferentes sitios de origen, para tratar de observar diferencias en las respuestas ante la exposición a los compuestos⁸⁷.

K562: Células de leucemia mielogénica crónica humana, obtenida de la pleura.

MCF-7: Células de carcinoma de glándula mamaria, presenta características diferenciales de las células epiteliales de mamífero, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógeno citoplasmáticos, puede contener la información del virus del papiloma humano .

C-33: Línea proveniente de adenocarcinoma de cérvix humano, ésta línea forma tumores en ratones desnudos.

HeLa: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, crece de forma adherente y posee la secuencia del virus del papiloma humano 18. Es la línea celular más ampliamente estudiada.

CALO: Células de carcinoma epidermal de cérvix humano, posee la información del virus del papiloma humano 18.

SW620: Son células de adenocarcinoma de colon linfático aisladas por Leibovitz en 1976 y son altamente tumorigénicas en ratones desnudos^{86,87}.

5.2 SOLUCIONES UTILIZADAS

5.2.1 MEDIO DE CULTIVO DMEM

Medio DMEM (Gibco)	contenido de un sobre
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	100 mL
HEPES (Sigma)	2.20 g
L-piruvato (Gibco)	10 mL
Aminoácidos (Gibco)	10 mL
NaHCO ₃ (Baker)	3.70 g
Agua desionizada estéril	900 mL
Suero fetal bovino inactivado	100 mL

- El contenido de un sobre del medio de cultivo se vierte y se disuelve en 700 mL de agua desionizada previamente esterilizada, al igual que los complementos (NaHCO₃ , HEPES, L-piruvato, antibiótico-antimicótico y aminoácidos)
- Se agrega agua desionizada estéril c.b.p. 900 mL

- Se esteriliza el medio de cultivo por el método de filtración a través de membrana millipore de 0.22 μ M.
- Con fines prácticos se toman partes alícuotas del medio de cultivo y se transfieren a botellas de vidrio estériles y se refrigera a 4°C para conservarlo.
- Según la cantidad de medio de cultivo que se desee utilizar, se complementa al 10% con suero fetal bovino inactivado previo a su utilización.
- Se realiza una prueba de esterilidad del medio de cultivo ya complementado previo a su utilización para el cultivo celular.

5.2.2 SOLUCION DE PBS-EDTA

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

- Se disolvieron todas las sales en 900 mL de agua desionizada.
- Se ajustó el pH con NaOH o HCl diluido hasta 7.4
- Se aforó a un litro en un matraz volumétrico y se homogenizó la solución.
- Se esterilizó en autoclave y se conserva a temperatura ambiente o en refrigeración con las precauciones necesarias para mantener la esterilidad.

5.2.3 SOLUCION DE PBS

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

- Para su elaboración se procede de la misma forma en que se elaboró el PBS-EDTA, sólo que se omitió la adición de ésta sal.

5.2.4 MEDIO DE CULTIVO SIN COMPLEMENTAR

Medio DMEM (Gibco)	contenido de un sobre
Antibiótico-antimicótico	100 mL
HEPES	2.20 g
L-piruvato	10 mL
Aminoácidos	10 mL
NaHCO ₃	3.70 g
Agua desionizada estéril	900 mL

- Para su elaboración se procede de la misma forma en que se elaboró el medio de cultivo complementado a diferencia de que se omitió la adición del complemento con suero fetal bovino al 10 %

5.2.5 SOLUCIÓN-REACTIVO DE MTT

Para preparar 50 mL de solución.

MTT (sigma)	125 mg
S.S.I. estéril	50 mL

- Se pesó el MTT utilizando guantes debido a la toxicidad del compuesto
- Se disolvió la sal en 50mL de S.S.I. estéril.
- Se esterilizó la solución por método de filtración usando membrana Millipore de 0.22 μ M.
- Se cubrió el tubo con papel aluminio y se conservó en refrigeración.

5.2.6 SOLUCION SALINA ISOTONICA ESTERIL (0.09%) S.S.I

NaCl (J.T. Baker)	0.090 g
Agua desionizada	100 mL

- Se disolvió la sal en 50mL de agua desionizada
- Se lleva al aforo con agua desionizada c.b.p. 100 mL
- Se esteriliza en autoclave y se almacena a temperatura ambiente, con las precauciones necesarias para conservar la condición de esterilidad.

5.2.7 SOLUCION DE PARAFORMALDEHIDO AL 4 % (PFA 4 %)

Paraformaldehído (PBS)	2.0 g
Solución de PBS	c.b.p. 100 mL

- Se pesa el PFA con guantes y cubrebocas debido a la toxicidad del compuesto.
- Se disuelve en 30 mL de PBS sobre la parrilla de calentamiento y agitación magnética constante.
- Ya disuelto, se afora en un matraz volumétrico hasta 50 mL con la solución de PBS
- Se filtra para retirar impurezas.

5.2.8 SOLUCIONES DE LAS AMIDAS

Se pesaron en balanza analítica las siguientes cantidades de los seis compuestos usados:

A = 0.0012 g

B = 0.0016 g

C = 0.0020 g

D = 0.0015 g

E = 0.0015 g

F = 0.0018 g

Posteriormente se disolvió uno de ellos en una cantidad arbitraria de DMSO, que no excedió los 100 μ L. Luego, a partir de este stock se hicieron las diluciones necesarias en medio de cultivo sin complementar para obtener el intervalo de concentraciones en el cual se probaron los compuestos. En base a los cálculos del primer compuesto se hicieron las soluciones de los compuestos restantes.

5.3 METODOLOGÍA

5.3.1 DESCONGELAMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES

- a) Se vertieron 3.5mL de medio de cultivo DMEM en cajas de Petri de 5 cm de diámetro; posteriormente se introdujeron a la incubadora con el fin de atemperar el medio contenido en ellas.
- b) Se toman los criotubos del banco de células contenidas en nitrógeno líquido (N_2L) o en congelación a $-70^{\circ}C$, y se fundió el contenido con la ayuda de la temperatura corporal.
- c) En el punto en el que aún persistía un botón de células congeladas en el criotubo, se vertió el contenido de éste dentro de las cajas de Petri y se distribuyó con movimientos circulares suaves.
- d) Las cajas se dejaron reposando en incubación de $37^{\circ}C$, 5% de CO_2 por dos horas hasta que las células se adhirieron al fondo de la caja Petri, pasado este tiempo se cambió el medio por medio fresco, para eliminar células que no adhirieron.

5.3.2 MANTENIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES

Se observó el cultivo celular con ayuda del microscopio invertido (IM). En el caso de que se observara una confluencia menor al intervalo de 80-90 % y la presencia de detritos en el medio, se procedió de la manera siguiente:

- a) Se aplicaron movimientos circulares y movimientos ascendentes y descendentes también a la caja Petri que contenía el cultivo.
- b) Se decantó el medio de cultivo con detritos por medio de un movimiento rápido y preciso
- c) Se agregó medio de cultivo DMEM fresco en la caja Petri que contenía el cultivo.

5.3.3 PROPAGACIÓN DE LAS LINEAS CELULARES

Cuando se observó que en la caja Petri que contenía el cultivo existía una confluencia por arriba del 80 % y la presencia de detritos se procedió de la siguiente manera:

- a) Se aplicaron movimientos circulares, ascendentes y descendentes a la caja Petri que contenía el cultivo.
- b) Por medio de un movimiento rápido y preciso se decantó el medio de cultivo con detritos hacia un vaso de precipitados

- c) Se llevó a cabo un lavado con PBS-EDTA, y se decantó el sobrenadante. Este paso se repitió las veces que fue necesario hasta ya no observar detritos.
- d) Se agregó la cantidad necesaria de PBS-EDTA para cubrir la capa celular en el fondo de la caja Petri, y se incubó ésta por 10 minutos a 37 °C.
- e) Concluido este tiempo se disgregó la capa celular con ayuda de una pipeta y con movimientos de succión y expulsión consecutivos; hasta observar turbidez en el PBS-EDTA debida a las células suspendidas.
- f) Se adicionó una parte alícuota de la suspensión celular a cajas Petri nuevas con medio de cultivo D-MEM fresco.
- g) Se homogenizaron las células dentro de las cajas con movimientos circulares suaves, posteriormente se incubaron a 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂ por el tiempo que fue necesario mantenerlas.

5.3.4 CONTEO CELULAR

Se realizó este conteo para colocar el número adecuado de células en cada pozo de las placas de 96 en donde se llevaron a cabo los ensayos de citotoxicidad.

- a) Antes de ser usada se limpió la cámara de Neubauer con etanol al 70 %, luego se secó, se colocó en posición horizontal
- b) Con la suspensión celular en PBS-EDTA, se hicieron las diluciones necesarias para hacer un conteo pertinente.
- c) Se tomó una alícuota de la dilución de aproximadamente 40 µL y se colocó en las cuadrículas de la cámara de Neubauer.

- d) Se reposó esta alícuota por 5 min. como máximo, para que las células sedimentaran.
- e) Se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio y se contaron las células existentes en los ocho cuadrantes para la cuenta de linfocitos. Siguiendo el siguiente criterio: en cada uno de los 16 cuadros pequeños que forman uno grande, se dibuja una "L" invertida con el lado izquierdo y el lado superior del cuadro. Posteriormente se cuentan las células contenidas bajo este espacio, esto para evitar contar una misma célula en dos cuadros pequeños diferentes. Si una célula se encuentra sobre una línea, se cuenta en el cuadro al cual corresponda la "L" sobre la que está.
- f) Cuando se obtuvo el promedio de la cuenta de los ocho cuadrantes se aplicó la siguiente relación:

$$C_{mL} = (P) (10^4)$$

de donde:

C_{mL} es la cantidad de células en un mililitro de suspensión.

P es el promedio de células contadas en los ocho cuadrantes.

Cuando se obtuvo la cantidad de células que se tenían en cada mililitro de suspensión, se pudo entonces calcular el volumen de suspensión adecuado que se agregó en cada pozo de la placa de 96 pozos para tener aproximadamente 6000 células en cada uno de ellos, y así se procedió a los ensayos de citotoxicidad.

5.3.5 EXPOSICIÓN A LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

Cuando se tuvieron dos cajas de petri de 15 cm de diámetro con una confluencia alta (mayor a 80 %) se realizó el siguiente procedimiento:

- a) Se repiten los pasos a) – e) de la sección de propagación
- b) Como se obtuvieron suspensiones con gran densidad celular, se procedió a llevar a cabo las diluciones pertinentes con DMEM como diluyente para facilitar el conteo celular.
- c) Luego de realizado el conteo se agregaron aproximadamente 6000 células en cada pozo de las placas de ELISA, utilizando un volumen de suspensión celular entre 20 y 50 μL por pozo.
- d) Se agregó medio DMEM c.b.p. 200 μL y se incubaron las placas a 37°C, 5% CO_2 y atmósfera húmeda por 24 horas.
- e) Al término del tiempo de incubación se agregó el compuesto que se diluyó con medio de cultivo sin complementar, de tal modo que se agregaron 50 μL adicionales para cada pozo, sumándose así 250 μL por pozo, en el cual se obtuvo así la concentración deseada.
- f) Se incubaron las placas de ELISA por 48 horas más a 37°C, 5% CO_2 y atmósfera húmeda.
- g) Al finalizar este tiempo se midió la viabilidad celular, por medio del ensayo del MTT, en respuesta a la exposición de los compuestos a las diferentes concentraciones.

Las 6 amidas α,β -insaturadas derivadas de furano (tabla 1) 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 fué menor o igual a 0.2%.

Para descartar que el efecto inhibitorio sea debido al DMSO.

5.3.6 TÉCNICA DEL MTT

- a) A todos los pozos de la placa se adicionaron 30 μ L del reactivo de MTT a una concentración de 2.5 mg/mL.
- b) Se incubaron las placas en las condiciones citadas anteriormente por un mínimo de 4 horas.
- c) Al término de este tiempo de incubación se removió el medio con reactivo de MTT decantando la placa.
- d) Los cristales de formazán formados por la reducción del MTT sedimentados en el fondo, se resuspendieron con 250 μ L de DMSO.
- e) Se realizó la lectura de absorbancia de las soluciones contenidas en los pozos con un lector de ELISA a 550 nm de longitud de onda.

El porcentaje de células vivas se calcula con respecto a un control solo, por medio de la siguiente ecuación:

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

Para aquellos compuestos que presentaron un por ciento de inhibición significativo con respecto al control, se procedió a calcular el valor de IC_{50} para la línea celular en dicho experimento.

5.3.7 MONTAJE DE CELULAS HeLa EN CUBREOBJETOS

El procedimiento que se describe a continuación tuvo como finalidad obtener células adheridas y fijadas a portaobjetos circulares, que posteriormente fueron utilizadas como muestras para realizar la tinción de hematoxilina y eosina, y para el experimento de detección de muerte celular in situ TUNEL, que se describirán en secciones siguientes.

- a) Se sigue el mismo procedimiento que indica la sección de propagación de las líneas celulares desde el inciso (a) hasta el (e).
- b) Las células HeLa se incubaron por 24 horas sobre cubreobjetos, a una densidad de 1×10^6 células en cajas de 10 cm de diámetro que contenían a los cubreobjetos
- c) Terminada esta incubación se expusieron las células a la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) del compuesto (A): N-(4-nitrobencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida (2.0 μ M) obtenida experimentalmente en ensayos de citotoxicidad a los siguientes tiempos de exposición: 12h , 24h.
- d) Como control se emplearon células sin tratamiento al compuesto (A) y como control positivo, células tratadas con paclitaxel a 50 nM.

5.3.8 FIJACION DE LAS MUESTRAS

- a) Cuando se cumplió un tiempo de exposición se extrajeron las cajas de la incubación.
- b) Se les retiró el medio de cultivo con remanentes de solución de compuesto (A): N-(4-nitrobenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida.
- c) Se lavaron con 4 mL de PBS.
- d) Se agregó la solución de PFA al 4% por un tiempo de 50 minutos a temperatura ambiente para lograr la fijación.
- e) Terminado el tiempo de fijación se retiró la solución PFA al 4% y se lavó nuevamente con 4 mL de PBS.
- f) Se retiró el PFA al 4 %, se hermetizaron las cajas con película adherente, y se guardaron a temperatura de 4 °C.

5.3.9 DETECCION DE APOPTOSIS POR MEDIO DE LA TECNICA DE TUNEL

Para evaluar el efecto que produce el compuesto (A) en la fragmentación de ADN en la línea celular HeLa sugerente de un proceso apoptótico; se llevó a cabo la detección de apoptosis (PCD) a nivel celular individual basada en el marcaje de fragmentos de ADN por medio de la técnica de TUNEL con el Kit comercial In situ cell death detection (Roche), la cual consiste en detectar la fragmentación característica del ADN que ocurre durante la apoptosis, y que rinde fragmentos de ADN de hebra doble o sencilla de un bajo y alto peso molecular respectivamente; dichos fragmentos pueden ser marcados en sus extremos 3'-OH con nucleótidos

modificados, en una reacción enzimática con la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal^{59,36}. Se siguieron los procedimientos que se mencionan a continuación:

5.3.9.1 BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA Y PERMEABILIZACION CELULAR^{59,36}

- g) Se lavaron las muestras de los cubreobjetos con PBS, y se incubaron con la solución bloqueadora (3 % peróxido e hidrógeno en metanol), por 10 minutos a temperatura ambiente.
- h) Se lavaron las muestras con PBS y se incubaron en la solución permeabilizante Tritón x-100 al 0.1 % en citrato de sodio al 0.1 % (J.T. Baker) durante dos minutos en hielo (4° C).

5.3.9.2 MARCAJE^{59,36}

- a) Se lavaron las muestras con PBS, luego se secaron con succión de vacío.
- b) Se añadieron 50 µL de la mezcla de reacción TUNEL, con la precaución de cubrir toda la superficie de la muestra con dicha mezcla y de cubrirlas con película adherente para evitar evaporación.
- c) Se incubaron las muestras en una cámara humidificadora por una hora a 37° C.
- d) Se lavaron nuevamente las muestras con PBS por 3 veces.
- e) Se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje (Dako)
- f) Las muestras se analizaron en el microscopio de fluorescencia.
- g) Se llevó acabo el mismo procedimiento con los controles mencionados en el inciso (d) de la sección de montaje de células HeLa.

5.3.9.3 CONTROLES

Control negativo: se incubaron las muestras con células fijadas y permeabilizadas en 50 μ L de amortiguador de reacción carente de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, y luego se procedió como en la sección de MARCAJE desde el paso c).

Control positivo: se incubaron las muestras fijadas y permeabilizadas con solución ADNasa (1 μ g/mL) a temperatura ambiente durante 10 minutos, para producir la ruptura del ADN. Luego se procedió como se indica en la sección de marcaje desde el paso (c) hasta el (f).^{59,36}

5.3.10 TINCION HEMATOXILINA-ESOSINA

Para observar el efecto en la morfología inducido por el compuesto (A) en células HeLa se empleó una tinción con Hematoxilina.

- a) En las muestras fijadas en los portaobjetos se hicieron lavados consecutivos con PBS.
- b) Se realizó un lavado con agua destilada por 5 minutos y se secaron por succión de vacío.
- c) Se tiñeron por 3 minutos con hematoxilina y luego se lavaron con PBS.
- d) Se tiñeron con Eosina por 4 minutos
- e) Se hicieron tres lavados con etanol al 100 %

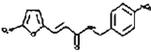
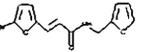
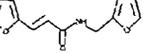
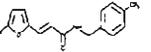
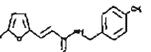
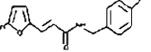
- f) Se deshidrataron las muestras secuencialmente con soluciones de etanol (al 70, 80, 96 y 100 %) por 2 minutos cada una.
- g) Se montaron sobre un portaobjetos utilizando resina clarión Para posteriormente observarse en microscopio de luz.

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADOS DE CITOTOXICIDAD

En este trabajo se probó el efecto citotóxico de seis amidas alfa-beta insaturadas derivadas de furano sobre seis líneas celulares tumorales de origen humano. Las diferentes líneas celulares se expusieron a concentraciones desde 0.2 hasta 80 μM por un periodo de 48 horas. Como control positivo se utilizó taxol a una concentración de 0.25 μM , y un control negativo en el cual se incubaron las células en las mismas condiciones pero en ausencia de compuesto; Además se llevó a cabo un control de disolvente a una concentración de 0.2 % como máximo en los pozos correspondientes. Los resultados de citotoxicidad en relación con la estructura de los compuestos se muestra en la tabla 2.

TABLA 2. IC₅₀ de las amidas α,β insaturadas derivadas de furano.

Comp	estructura	IC ₅₀ (μM) K-562	IC ₅₀ (μM) SW620	IC ₅₀ (μM) MCF-7	IC ₅₀ (μM) C-33	IC ₅₀ (μM) CALO	IC ₅₀ (μM) HeLa
A		17.4±3.5	12.6±2.8	7.6±0.16	55.3.7±3.8	8.5±3.1	1.6±0.57
B		16.4±3.2	18.2±0.8	13.4±0.51	11.2±2.2	23.5±0.61	4.8±1.6
C		Sin act.	Sin act.	Sin act.	Sin act.	Sin act.	Sin act.
D		35.1±1.6	9.0±1.1	13.5±1.4	25.5±0.36	13.7±2.5	3.6±1.8
E		7.7±2.4	10.5±1.11	12.0±0.24	11.7±2.9	17.1±1.32	6.5±0.1
F		11.1±2.0	2.7±1.1	15.2±1.2	15.6±0.16	11.6±3.8	3.7±1.9

El valor de IC₅₀ expresado en términos de concentración micromolar (μM) en las líneas celulares tratadas con las amidas α,β insaturadas derivadas de furano, es el promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar (D.S.) Sin act. significa sin actividad.

Para la línea celular K562 se puede observar que las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) de los 6 compuestos se encuentran en un intervalo comprendido entre 7 y $35\mu\text{M}$, excepto el compuesto (C) que no presenta actividad inhibitoria. Para esta línea celular los compuestos más activos resultan ser los compuestos (E y F) de los cuales se obtuvieron valores de (IC_{50}) cercanos a $10\mu\text{M}$.

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular K562

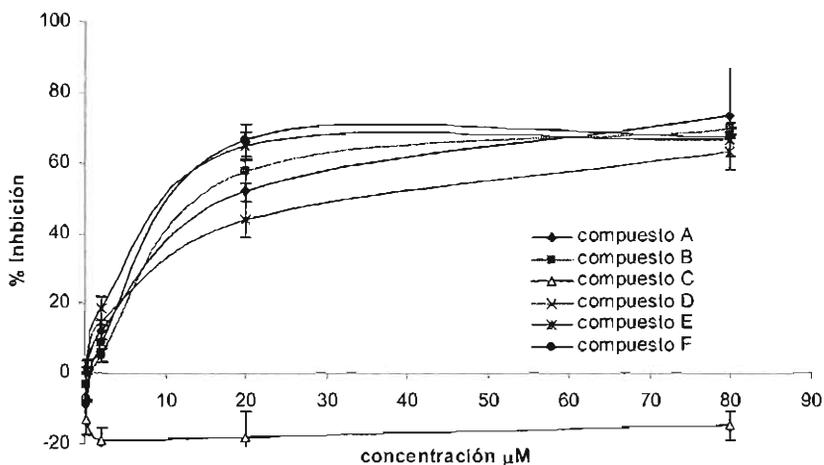


FIGURA 5. El gráfico representa el % de inhibición en la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología.

Para la línea celular SW620 se puede observar que las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) de los 6 compuestos se encuentran por debajo de 20 μM , excepto el compuesto (C) que no presenta actividad inhibitoria. Para esta línea celular los compuestos más activos resultan ser los compuestos (F y D) de los cuales se obtuvieron valores de (IC_{50}) por debajo de 10 μM .

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular SW620

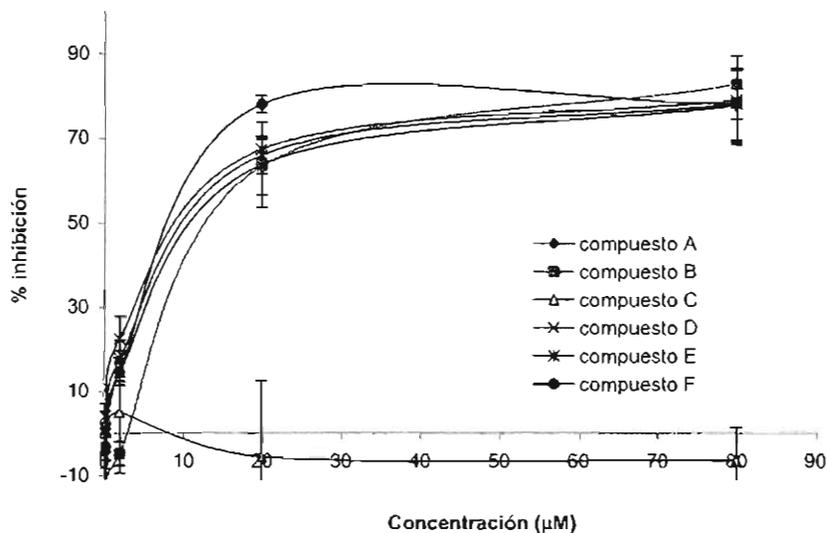


FIGURA 4. El gráfico representa el % de inhibición de la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología.

En la figura 7 se muestra el resultado de los ensayos de citotoxicidad de los compuestos (A) hasta (F) en la línea celular tumoral C-33. El intervalo dentro del cual se encuentran los valores de (IC_{50}) es de 10-55 μ M; excepto el compuesto (C) que no presenta alguna actividad citotóxica en el rango de concentraciones probadas. Los compuestos más activos son el (B, E y F) los cuales presentan valores de (IC_{50}) cercanos a 10 μ M.

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular C-33

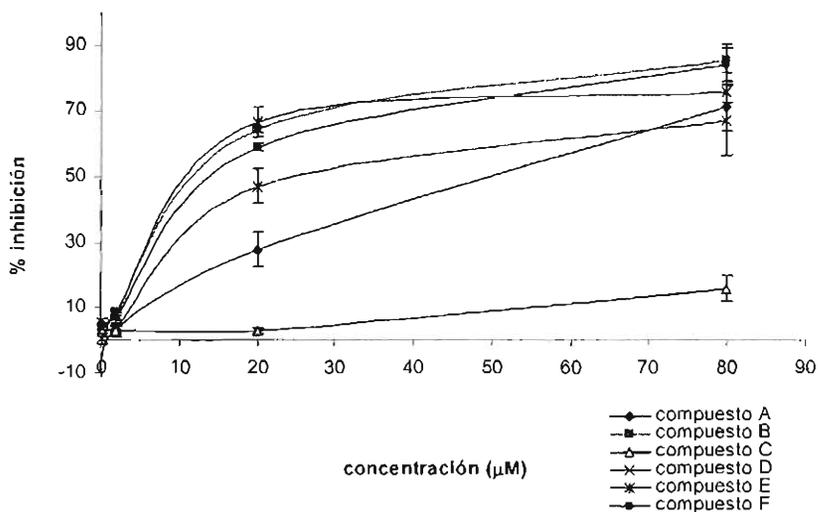


FIGURA 7. El gráfico representa el % de inhibición de la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología

En la figura 8 se muestra el resultado de los ensayos de citotoxicidad en la línea celular CALO con los compuestos (A) hasta (F). Los valores de IC_{50} están comprendidos en un intervalo de 8 a 25 μM aproximadamente. En estos experimentos los compuestos más activos son el (A) y el (F) con valores de IC_{50} alrededor de 10 μM . Una vez más, como lo observado en las otras líneas celulares el compuesto (C) no presenta actividad alguna en esta línea celular.

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular CALO

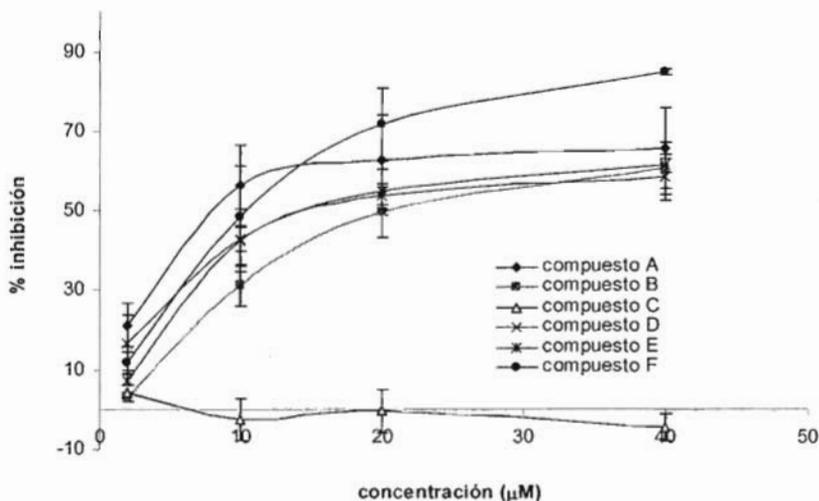


FIGURA 8. el gráfico representa el % de inhibición de la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología

En la figura 9 se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad para la línea celular HeLa. Los valores de IC_{50} se encuentran por debajo de $20\mu M$. El compuesto (C), no presentó actividad citotóxica en esta línea celular como en las líneas celulares tumorales analizadas anteriormente

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular HeLa

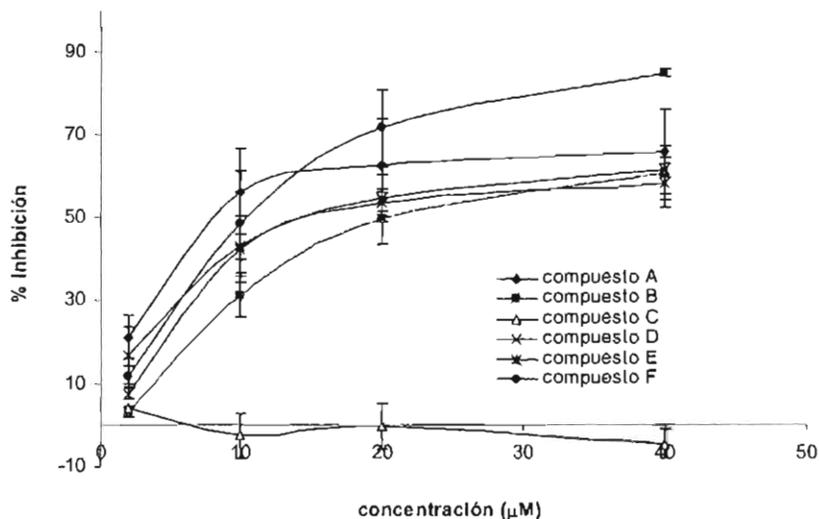


FIGURA 9. El gráfico representa el % de inhibición de la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología.

Finalmente en la figura 10 se muestra el resultado de los ensayos de citotoxicidad que presentan los compuestos A hasta F en la línea MCF7. Los valores de IC_{50} se encuentran en una rango de 8 a $15\mu M$; el compuesto más activo es el denominado (A), con valor de IC_{50} por debajo de $10\mu M$. El compuesto (C) no presenta actividad citotóxica en esta línea celular como en las demás líneas probadas.

Actividad citotóxica de los compuestos probados en la línea celular MCF-7

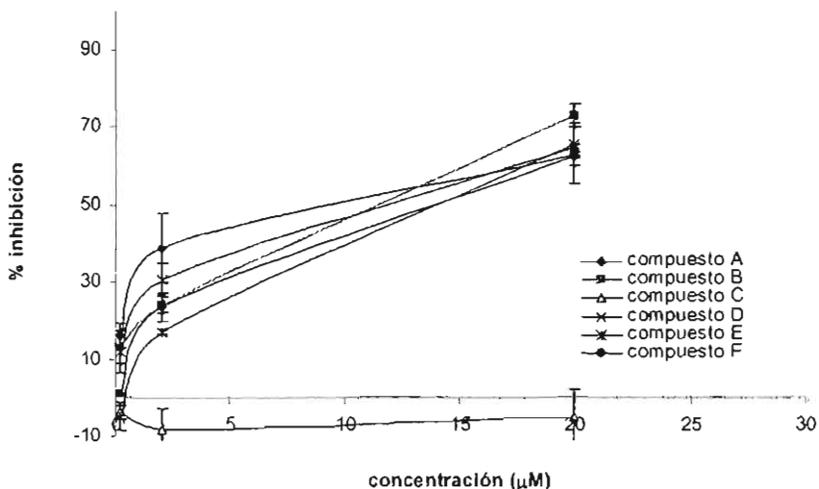


FIGURA 10. El gráfico representa el % de inhibición de la proliferación en función de la concentración tras la exposición a las amidas derivadas de furano. Estos resultados representan el promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm la D.S. La citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología.

6.2 DETECCION DE APOPTOSIS

Los resultados de los experimentos de la técnica de TUNEL efectuados en las células HeLa se muestran en los paneles 11, 12, 13 y 14.

En el panel 11 se muestran células Hela al inicio del experimento, es decir, a un tiempo cero de exposición. Como control del experimento.

En el panel 12 A se presenta el control positivo de la técnica en el cual las células HeLa se trataron con ADNasa como se indica en la sección de metodología. Se observa fluorescencia verde extensa en varias células lo que indica la degradación del ADN y algunos puntos que podrían ser cuerpos apoptóticos. En el panel 12 B se presenta el control negativo de la técnica que se elaboró como se indica en la sección de la metodología. No se observa fluorescencia en alguna célula debido a que no se incluye la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal. En el panel 12 C se muestra un control de fragmentación inducido por un compuesto; en el cual se utilizaron células tratadas con una concentración de 50 nM de taxol por 24 horas. Se observa la presencia de puntos verdes o cuerpos apoptóticos y un patrón de degradación característico del ADN.

En el panel 13 A se presenta el resultado de la técnica de TUNEL cuando las células Hela se trataron con el compuesto (A) por 12 horas a una concentración de 2.0 μ M. Se pueden observar algunas células con fluorescencia y la presencia de algunos posibles cuerpos apoptóticos dentro de una célula. Un resultado similar se obtiene a las 24 horas de exposición (panel 14 A), donde también hay muy pocos cuerpos apoptóticos., pero, ya se observa la presencia

de un mayor número de células que presentan el patrón de fluorescencia que caracteriza la degradación del ADN.

En los panel 13 B y 14 B se presentan los controles de disolvente (DMSO), sin el compuesto A, para las 12 y 24h de exposición respectivamente. No se observan células que presenten el patrón de fluorescencia que demuestre la fragmentación nuclear.



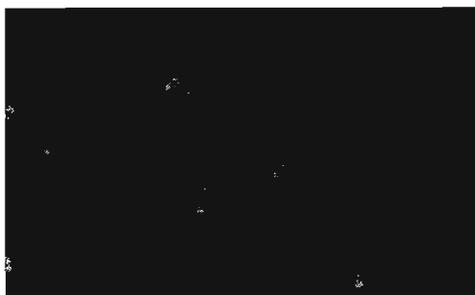
panel 11 . Técnica de TUNEL. Control del experimento. Células HeLa al inicio del experimento a tiempo cero de exposición al compuesto (A) N-(4-nitrobencil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propenamida (2.0 μ M). 40x.



A

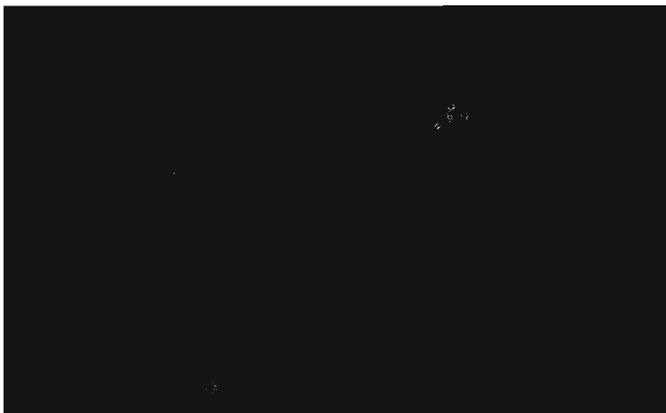


B



C

Panel 12. técnica de TUNEL . Panel A control positivo de células HeLa tratadas con ADNasa 40x. Panel B control negativo de la técnica elaborado como se describe en la sección de metodología 40x. Panel C exposición de células HeLa a taxol 50 nM por 24 horas 20x. La fluorescencia es indicativa de degradación de ADN.

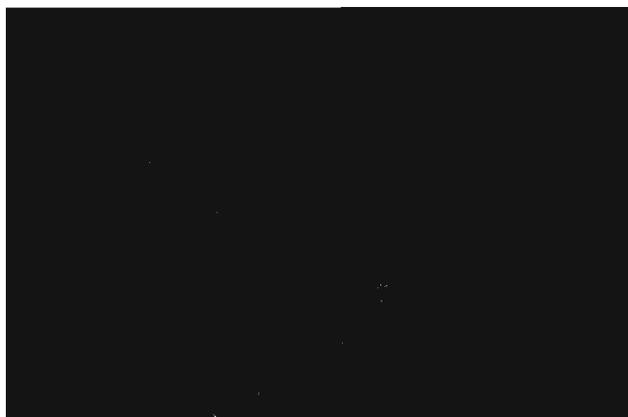


A



B

panel 13. Técnica de TUNEL. Panel A tratamiento con el compuesto (A) N-[4-nitrobenzyl]-3-(5-nitro-2-furil)-2-[E]-propenamida por 12h a concentración de 2.0 μM 40x . Panel B control de disolvente (DMSO) a 12h. La fluorescencia indica degradación de ADN 40x.



A



B

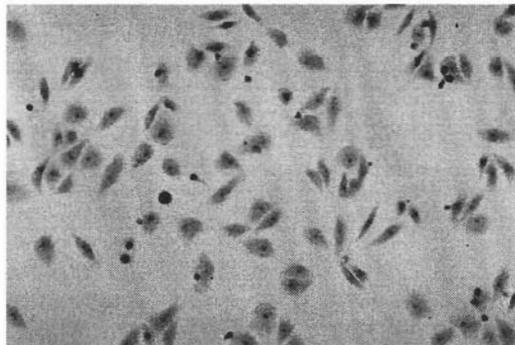
panel 14. Técnica de TUNEL. Panel A tratamiento con el compuesto (A) N-(4-nitrobenzilo)-3-(5-nitro-2-furil)-2-[E]-propenamida por 24h a concentración de 2.0 μ M 40x .Panel B control de disolvente a 24h 40x. La fluorescencia indica degradación de ADN.

6.3 DESCRIPCIÓN DE LA MORFOLOGÍA CELULAR

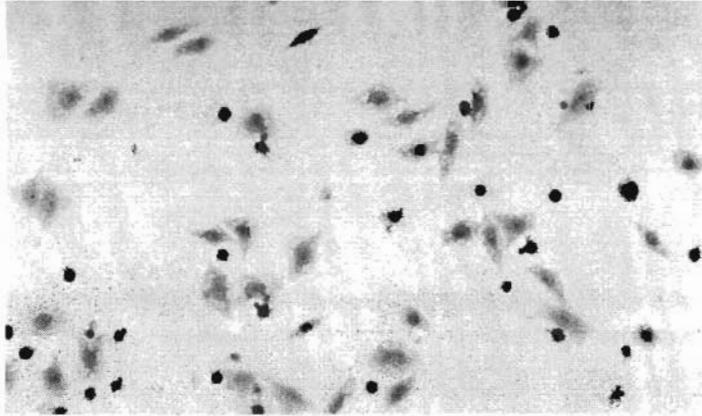
En el panel 15 se muestran células HeLa al inicio del experimento como un control del experimento a tiempo cero de exposición.

En el panel (16 A) se presenta la morfología de las células HeLa por una exposición de 12 horas al compuesto (A) a una concentración de 2.0 μM . En esta imagen se observa una confluencia celular normal con respecto al control sin tratamiento panel (16 B), una ligera pérdida de la adhesión intercelular y un daño visible en células individuales a modo de vacuolas.

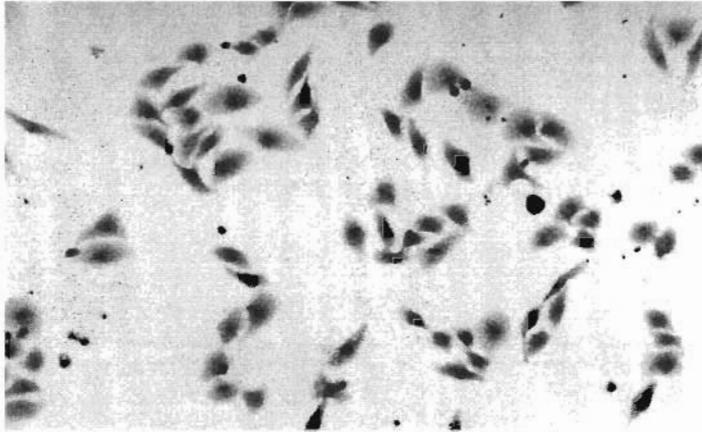
En el panel (17 A) se presenta la morfología celular tras una exposición de 24 horas con el compuesto (A) N-(4-nitrobenzil)-3-(5-nitro-2-furil)-2-(E)-propanamida. Se puede observar una pérdida aún mayor de la adhesión intercelular, una disminución en el tamaño de la célula individual, y en algunas células, condensación de la cromatina y pérdida visible del citoplasma, todo esto con respecto al control sin tratamiento del panel (17 B).



Panel 15. Morfología celular en la línea HeLa. Células al inicio del experimento a tiempo cero de exposición 20x. Control del experimento.

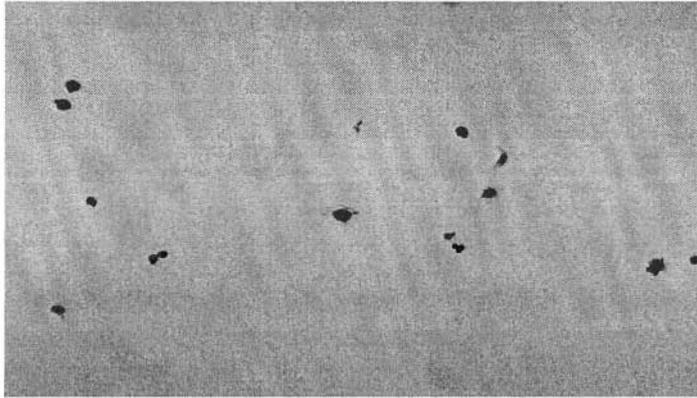


A

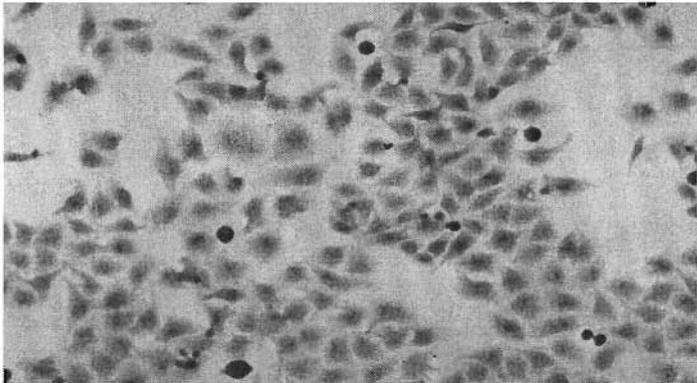


B

Panel 16. Morfología celular en la línea HeLa. Panel 16 A tratamiento con el compuesto A por 12h a concentración de 2.5 μ M 20x. Se observa daño visible en citoplasma y reducción del volumen celular. Panel 16 B control de disolvente (DMSO) a 12h 20x.



A



B

Panel 17. Morfología celular en la línea HeLa. Panel 17 A tratamiento con el compuesto A por 24h a concentración de $2.5 \mu\text{M}$ 20x, se observa condensación de cromatina pérdida de adhesión y disminución en la proliferación. Panel 17 B control de disolvente (DMSO) a 24h 20x.

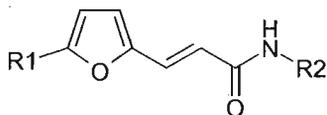
7. DISCUSION

En el presente trabajo se evaluó el efecto citotóxico de un grupo de nuevas amidas α,β -insaturadas derivadas de furano, en líneas celulares tumorales. La investigación se enfocó al estudio del efecto citotóxico de estos compuestos en relación con su estructura química.

Con el objetivo de investigar si la presencia de diferentes sustituyentes sobre el anillo de furano o en la posición R₂ de la molécula, produciría alguna diferencia sobre los efectos citotóxicos; se utilizaron 6 diferentes compuestos, de los cuales se esperaban diferentes tipos de actividades de acuerdo a su estructura. En la tabla 3 se muestran seis compuestos; tres de los cuales (A, D y F) contienen al sustituyente nitro en la posición 5 del anillo de furano (R1) con grupos atrayentes de electrones en la posición *para* del anillo de benceno. Otro compuesto (B) contiene el sustituyente nitro en la posición 5 del anillo de furano con otro anillo de furano en la posición (R2) de la molécula. Un compuesto más (E) posee también el sustituyente nitro en la posición (R1) de la molécula, solo que contiene el grupo metilo en la posición *para* del anillo bencénico, el cual es un donador de electrones. Finalmente el compuesto (C) que no posee sustituyente en la posición (R1) de la molécula y solo contiene un anillo de furano sin sustituyente alguno.

En el presente trabajo los compuestos (A, B, D, E y F) presentaron actividad citotóxica en todas las líneas celulares tumorales probadas, pero el compuesto (C) no presentó actividad de tipo citotóxica en alguna de las líneas celulares probadas (ver la tabla 2).

Tabla 3. Diferencias estructurales de la 9 amidas α,β - insaturadas derivadas de furano



Compuesto	R1	R2
A	NO ₂	
B	NO ₂	
C	H	
D	NO ₂	
E	NO ₂	
F	NO ₂	

Los resultados obtenidos nos sugieren que la presencia del sustituyente nitro en la posición 5 del anillo de furano, tal vez confiere la propiedad citotóxica en las líneas celulares, propiedad, que está ausente en el único compuesto que no contiene este sustituyente en su estructura (compuesto C). En los compuestos activos tiene particular importancia la presencia del sustituyente nitro en R1, ya que si se hace una comparación simple entre el compuesto (B) y el compuesto

(C), el sustituyente nitro es la única diferencia entre ellos que tal vez influye en la propiedad citotóxica del compuesto B.

En cuanto a la presencia de los sustituyentes donadores o atractores en el grupo fenilo, no se observa que alguno proporcione en algún compuesto una mayor propiedad citotóxica en alguna de las líneas celulares tumorales, lo que nos podría sugerir que este sustituyente nitro en el furano es el principal responsable de la actividad citotóxica.

Se ha reportado ya en algunos trabajos anteriores, que el grupo nitro en el anillo de furano hace una diferencia en las características citotóxicas de los compuestos que lo contienen, como es el caso del nifurtimox y compuestos con semejanzas estructurales.^{20,22,24,27,28}

En los ensayos de citotoxicidad la línea celular HeLa, fue la más sensible con todos los compuestos. Las otras dos líneas de carcinoma de cérvix probadas (Calo y HeLa), si bien resultaron también sensibles, lo fueron en menor grado que HeLa, lo que podría explicarse por características intrínsecas determinadas genéticamente o por una deficiencia mínima en la capacidad antioxidante de esta línea celular^{71,72,73}.

Cuando se realizó una tinción para estudiar la morfología que presentaron las células al ser expuestas al compuesto (A), se observaron características importantes como: la pérdida de la adhesión intercelular, la condensación de cromatina en algunas de ellas y un daño visible en integridad citoplásmica. A partir de las 24 horas se observó una inhibición clara en la proliferación con la presencia

de células en las que se puede apreciar una condensación en la cromatina, que podrían tal vez sugerir la presencia de fragmentos de cromatina condensada o fragmentos de citoplasma.

Es importante observar que también a partir de las 24 horas de exposición al compuesto en estudio, se observa un mayor número de células que presentan la fragmentación nuclear que se pone de manifiesto con el marcaje logrado con la técnica de TUNEL. Estos resultados podrían sugerir que el tipo de inhibición en la proliferación celular por exposición al compuesto (A) pudiera ser causados por una muerte celular apoptótica^{36,59}.

Se podría proponer en base a los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, donde se observa la importancia de la presencia del sustituyente nitro sobre la citotoxicidad; que estos compuestos poseen un mecanismo de acción similar al de la molécula líder, el nifurtimox. Se ha reportado que el sustituyente nitro en el furano puede reaccionar con reductores biológicos como el NADP(H) para generar especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno, de las cuales, el radical hidroxilo generado es el más reactivo; talvez el responsable de la mayor parte del daño oxidativo que se pudiera presentar causado por ERO^{20,22,24,26,27}. Es importante mencionar que, con algunas excepciones, los niveles basales de las defensas antioxidantes son frecuentemente aberrantes en las células tumorales, y que se ha observado que las actividades de algunas enzimas antioxidantes están disminuídas en algunas líneas tumorales si se comparan con células de las que derivaron^{71-73,52}. Lo anterior podría no ser muy concreto para apoyar el mecanismo de acción de las amidas derivadas de furano, pero en el caso de que las células probadas tuvieran intactos sus mecanismos antioxidantes, en algún punto, estos

podrían ser superados por sobreproducción de ERO, y presentar así, la muerte celular. Así que en el caso de estos compuestos se podría explorar esta posibilidad.

Al existir una producción de ERO dentro de la célula tras el tratamiento con el compuesto A, el tipo de muerte celular inducido observado podría ser la apoptosis, que bajo condiciones de estrés oxidativo puede ser inducida por daño directo en ADN o proteínas intracelulares^{34,84,76}. Si la mitocondria tiene un papel importante para integrar y amplificar las señales de muerte originadas al interior de la célula, se podría pensar en la vía intrínseca de señalización como un factor importante en la muerte celular producida por este grupo de compuestos, si existiera daño en la integridad de la estructura mitocondrial^{36,37}. Sin embargo no es posible con los resultados presentes descartar la muerte de tipo necrótica, que también se ha reportado inducida por ERO^{57,43} aunado esto al hecho de que un patrón de fragmentación nucleosomal se puede presentar en etapas tardías de necrosis³⁶. Finalmente para tener un mayor acercamiento sobre el tipo de muerte celular que se presente en células tratadas con este tipo de compuestos deberán de llevarse a cabo otros experimentos para obtener resultados a través de los cuales se puedan generar conocimientos más claros acerca del mecanismo de acción de estos compuestos³⁸.

8. CONCLUSIONES

1. Se determinó que todos los compuestos probados presentaron actividad citotóxica sobre las líneas celulares, excepto el compuesto C, que no presentó actividad de tipo citotóxica en alguna línea celular.
2. Los valores de IC₅₀ que se encontraron en los ensayos de citotoxicidad están dentro de un rango comprendido entre 1.6 hasta 55µM.
3. De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad el grupo NO₂ como sustituyente en la posición 5 del anillo de furano confiere la actividad citotóxica de las amidas α,β-insaturadas derivadas de furano.
4. La línea celular Hela, resultó ser la más sensible a la exposición con cada uno de los compuestos.
5. El compuesto C que no posee como sustituyente al grupo nitro en el anillo de furano, no presentó actividad citotóxica en alguna de las líneas celulares probadas.
6. El compuesto (A) a partir de 12 horas de exposición indujo una fragmentación nuclear que se evidenció por medio de la técnica de TUNEL, lo que nos podría sugerir una posible muerte celular de tipo apoptótica sobre la línea celular HeLa.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Fernández cantón S, 2004, El IMSS en cifras: la mortalidad en la población derechohabiente, 2003. *revista médica IMSS*; 42(4), 353-364.
2. Jemal A. C. Tiwari R.C, 2004, Cancer statistics 2004. *CA Cancer J. Clin*, 54, 8-29.
3. SECRETARÍA DE SALUD MEXICO. Estadísticas de mortalidad en México: muertes registradas en el año 2002, 2004.. *Salud pública de México*, vol. 46(2), 169-185.
4. División técnica de información estadística en salud. El IMSS en cifras-la mortalidad en la población derechohabiente, 2003. 2004, *Revista Médica del IMSS*, 42 (4), 353-364.
5. Robbins, Patología estructural y funcional, Interamericana Mc Graw-Hill. 5ª edición. Neoplasia (7).2000.
6. Ibarra Pérez C., Oncología del Tórax, Editorial Porrúa, 1ª edición, 1999, 23-31.
7. Calabresi P. Chabner B. Goodman and Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. Mc Graw-Hill. 9ª edición. 1996.Vol2, 1301-1309.
8. W. S. Klug. Conceptos de genética. 5ª edición. 2000. 626-629.
9. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Inmunología celular y molecular, 4a edición, Mc graw Hill-interamericana. 2000. 398-401
10. Silva Lima B, Van Der Laan JW,2000, Mechanisms of nongenotoxic carcinogenesis and assessment of the human hazard. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2000, 32, (135-143).
11. Lusch A, 2005, Nature and nurture-lessons from chemical carcinogenesis. *Nature reviews/cancer*, 5, 113-125
12. Williams G, 2001, Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 166, 3-10.
13. W eisburger H J, 2001, Antimutagenesis and anticarcinogenesis from the past to the future, *Mutation Research*, 480-481, 23-25.
14. Guengerich F P, 2001, Forging the links between metabolism and carcinogenesis. *Mutation Research*, 488:195-209.
15. Bruce A, G Roberts. Chemotherapy and the war on cancer. *Nature reviews/cancer*. 2005. 5(65-72).
16. Blajeski L. A, J. Kottke T, 2001, Amultistep model for Paclitaxel-induced apoptosis in human breast cancer cell lines. *Experimental cell research*. 270, 277-288.

17. J.D. Maya. (2003), *Tripanosoma cruzi* effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochemical Pharmacology*, 65, 999-1006.
18. Marcondes G M, Borelli P, 2000, Acute tripanosoma cruzi infection is associated with anemia, leukopenia and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment, *Microbes and infection*, 2, 347-352.
19. Moreno S, Mason P R, (1984), Distinct reduction of nitrofurans and metronidazole to free radical metabolites by *Tricomonas foetus* hydrogenosomal and cytosolic enzymes. *The journal of biological chemistry*, 259(13), 8252-8259.
20. Docampo R, (1980), Generation of free radicals from nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* and in the mammalian host. *The host invader interplay*, 677-681.
21. Aguado García J M. et al. Farreras Rozman Medicina Interna. 13ª edición. 2000. capítulo de oncología. 1133-1137
22. Dubin M., Grinblat L., (1987), Nitrofurans inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Federation of European Biochemical*, 220(1), 197-200.
23. Raether W, Hanel H, (2003) Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity, *Parasitol Res*, 90, 19-39.
24. Daghashtani A N, Rossa N M, (2004), Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitacrine, towards leukemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light, *Journal of photochemistry and photobiology*, 75, 27-32.
25. Aguirre G, Cabrera E, (2004), Design, synthesis and biological evaluation of 5 new potent 5-nitrofuryl derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents, studies of trypanothione binding site. *European journal of medicinal chemistry*, 39, 421-431.
26. Montalto de Mecca M, (2002), Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. *Toxicology letters*. 136, 1-8.
27. R. Pozas, J. Carballo. (2005). Synthesis and in vitro antitrypanosomal activity of novel Nifurtimox analogues. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*. 15, 1417-1421.

28. Franco Cea A. Tesis de licenciatura Síntesis y cálculo de propiedades fisicoquímicas de propenamidas N-sustituída con probable actividad tripanocida. 2002, Facultad de Química UNAM.
29. Carballo Perea A J, Tesis Maestría Síntesis y actividad tripanocida de análogos de nifurtimox y benznidazol., 2001. Facultad de Química, UNAM
30. Eluani Cabrera M. Tesis de Licenciatura Síntesis de amidas α,β -insaturadas del furano, con posible actividad tripanocida y determinación de su actividad larvívica en *Artemia Salina*., 2003. Facultad de Química, UNAM.
31. Rodríguez López E M, tesis de Licenciatura con título: Síntesis de análogos de Nifurtimox con posible actividad leishmanicida y determinación de su actividad larvívica en *Artemia salina*. 2003, Facultad de Química, UNAM.
32. Díaz Ruiz R A. Tesis de licenciatura El papel protector de los carbohidratos contra los radicales libres de oxígeno, 2004, Facultad de Química UNAM.
33. Baranda Avila N. Evaluación de la actividad citotóxica de amidas α,β insaturadas derivadas de furano en líneas celulares tumorales, 2004, Facultad de Química UNAM.
34. Higuchi Y. (2003) Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress, *Biochem Pharmacol*, 66 (8), 231-251.
35. Nair J, Barbin A, (1999) Etheno-DNA base adduct from endogenous reactive species, *Mutat Res*, 424 (1-2), 59-69.
36. Roche, In situ Cell death detection POD Instruction manual., 4, feb. 1999
37. Kroemer, G y Reed, JC, (2000) Mitochondrial control of cell death, *Nat med*, 6(5), 513-519.
38. Kauffmann, SH, (2000), Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, *Exp cell Res*, 256 (1), 42-9
39. Moreno A M, Cuéllar G C, (2000), Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones, *Cancerología*, 56(4), 275-280.
40. Schuler M, Bossy-Wetzal, (2000), p53 Induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome C release, *The journal of bio chem*, 275(10), 7337-7342.
41. Urso L M,(2003), Oxidative stress exercise and antioxidant supplementation, *toxicology*, 189, 41-54.

42. Sasaki Y C, Passanitti A, (2000), Expression of E-Cadherin reduces Ncl-2 expression and increases sensitivity to etoposide-induced apoptosis, *Int J. Cancer*, 86 660-666.
43. Okada H, Mak W T, (2004), Pathways of apoptotic and non apoptotic death in tumour cells, *Nature/cancer*, 4, 592-602.
44. Zhang Y J.(2002), Apoptosis-based anticancer drugs, *Nature reviews*, 4.
45. Bidère N, senik A, (2001), Caspase independent apoptotic pathways in T lymphocytes: a minireview, *Apoptosis*, 6(5), 371-375.
46. Blagosklonny V M, (2003), Apoptosis, proliferation, diferentiation: in search of the order, *seminars Cancer biology*, 13, 97-105.
47. Fesus L, davies J P, (1991) Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death, *European J cell bio*, 56, 170-177.
48. Dassoneville L, (2000), Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloidAscididemin and induction of apoptosis in Leukemia cells, *Biochemical pharmacology*, 60, 527-537.
49. Williams T G, (1991), Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis, *Cell*, 65, 1097-1098.
50. Richard A, Zakheri Z,(2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory, *nature reviews/molecular cell biology*, 2, 545-550.
51. Hengartner O M, (2000), The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407, 770-776.
52. Gómez González E O, Zentella A, (2000), Apoptosis y muerte celular programada, *BEB*, 17(3), 105-114.
53. Zhivolovsky B, (2003), Apoptosis and cancer: where we are and were to go, *Cancer biology*, 13, 93-95.
54. Eskens F, (2004), Angiogenesis inhibitors in clinical development, *British J of cancer*, 90, 1-7.
55. Sullivan López-G J, Prado-García H, (2004) Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-HC on human lung carcinoma cells, *Lung cancer*, 43, 275-283.
56. Gewies A. (2003), Introduction to apoptosis, *Aporeview*, 1-26
57. Jattela M. (2004), Multiple cell death pathways as regulators of yumour initiation and progression, *Oncogene*, 23, 2746-2756.
58. Longley DB, Johnston PG, (2005), Molecular mechanisms of drug resistance, *journal of pathology*, 205, 275-292.

59. Gong J, Gorczyca W, (1993), Detection of DNA Strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and Nick translation assays, *cancer research*, 53, 1945-1951. .
60. Emanuele S, D'anneo A, (2004), Sodium butyrate induces apoptosis in human hepatoma cells by a mitochondria/caspase pathway, associated with degradation of beta.catenin, pRb and Bcl-XL ,*European journal of cancer*, 25(4), 1531-1540.
61. Yang Shur-er, HsiehMing-Tsuen, (2002), Down regulation of Bcl-XI, release of cytochrome C and sequential activation of caspases during Honokiol-induced apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells, *Biochemical pharmacology*, 63, 1641-1651.
62. R. Hamid. (2004), Comparison of alamar blue and MTT assays for high throughput screening. *Toxicology in vitro*. 18, 703-710.
63. Henrik M. Kassack M U. (2004), Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *Journal of biomolecular screening*, 9(6), 506-515.
64. Green L.M, Jeanne L, (1984), Rapid Colorimetric assay for cell viability: Application to quantitation of cytotoxic and growth inhibitory Lymphokynes. *Journal of immunological methods*. 70, 257-268.
65. Mossman T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.*Journal of immunological methods*.. 65, 55-62.
66. J.M. Sargent, C.G.taylor. 1989, Appraisal of the MTT assay as rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukemia. *J. Cancer*. 60, 206-210.
67. Monks J, A. Scudero D. 1991, Feasibility of a high flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Articles*, 83(11), 761-769.
68. Hazel Lum, Kenneth Roebuck, 2001, Oxidant stress and endothelial cell dysfunction, 280, 719-741.
69. Lili zhou,(1999), Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue, *Journal of cellular physiology*, 180, 182-189.
70. Pieri L, Dominici S, (2003), redox modulation of protein kinase/phosphatase balance in melanoma cells: the role of endogenous and gamma-glutamyltransferase-dependent H₂O₂ production, *Biochimica et biop acta*, 1621, 76-83.

71. Matés M, (2000), Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species, *Toxicology*, 153 (1-3), 83-104.
72. Matés J M, Francisca M, (2000) role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *The int J biochem and biol*, 32, 157-170.
73. R G Allen, Arthur K Balin, (2003), effects of oxygen on the antioxidant responses of normal and transformed cells, 289, 307-316.
74. Matés J M, Pérez-Gómez C, (1999), Antioxidant enzymes and human diseases, *clinical biochemistry*, 32(8), 595-603.
75. Stratowski T, Nathan F C, (1991), Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumour cells, *Cancer research*, 794-798.
76. Thannickal, V J, (2000), reactive oxygen species in cell signaling, *Am J Physiol lung cell mol Physiol*, 279, 005-028.
77. Beata M Gruber, elzbieta L, (2001), Activation of programmed cell death (apoptosis) by adriamycin in human neoplastic cells, *Mutation research*, 484, 87-93.
78. L E feinendegen, (2003), reactive oxygen species in cell responses to toxic agents. *Human and experimental toxicology*, 21, 85-90.
79. Nakagawa Y, Akao Y, (2002), Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines, 70, 2253-2269.
80. Waters D M, (1999), Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens, 437, 21-49.
81. Velasco-Velázquez M A, Sullivan López J, (1999), Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas, 51, *Revista de investigación clínica*, (51), 183-193.3
82. Cash C D, 1997, Are the reactive oxygen-derived species interactive properties of the many therapeutic drugs, *gen pharmacology*, 28(2), 169-175.
83. Erdal H, Berndtsson M, (2004), Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *PNAS*, 102(1): 192-197

84. Stadtman ER (1986) Cyclic oxidation and reduction of methionine residues of proteins in antioxidant defense and cellular regulation, *Arch Biochem Biophys*, 423 (1), 2-5.
85. Nair J, Barbin A (1999), etheno-DNA base adduct from endogenous reactive species. *Mutation research*, 424(1-2), 59-69
86. ATCC, Catalogue of Cell lines and Hybridomas, 7a ed. Rockville, Maryland, 1992, 4, 122, 123, 129, 130, 219, 220, 223p.
87. D C Darling, S J Morgan. *Animal cells culture and media*. London U.K. Ed Wiley. 1994. pp 62-85
88. Marchetti P, Decaudin D. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status of mitochondrial function. *Eur journal of Immunology*. 27(1): 289-296.
89. Pérez Trueba G, 2003, Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, *Rev. Cubana invest biomed*, 22(1):48-57.