



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

UNAM  
POSGRADO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

"Citotoxicidad y mecanismo de acción de nuevos  
heterodiariliden - ciclohexanonas en líneas  
celulares tumorales"

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A :

QFB JOSE DOLORES SOLANO BECERRA

Tutor: DRA. ANGELINA QUINTERO RUIZ



MÉXICO, D. F.

2005

M: 350072



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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 202 de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Angelina Quintero Ruiz.



# PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ENTIDAD ACADÉMICA FACULTAD DE QUÍMICA E  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

Of. No. PMDCB/999/2004

**QFB. JOSÉ DOLORES SOLANO BECERRA**  
Alumno de la Maestría en Ciencias Bioquímicas  
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico en reunión del día 25 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "Citotoxicidad y mecanismo de acción de nuevos heterodiariliden-ciclo hexanonas en líneas celulares tumorales", dirigida por la Dra. Angelina Quintero Ruiz.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

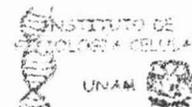
PRESIDENTE	Dr. José Pedraza Chaverri
VOCAL	Dr. Marco A. Cerbón Cervantes
SECRETARIO	Dr. Alejandro Zentella Dehesa
SUPLENTE	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
SUPLENTE	Dr. Alejandro García Carrancá

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D. F., a 28 de octubre de 2004.  
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo



## Agradecimientos.

A Jesús por acercarme a nuestro Padre.

Agradezco a la Dra. Angelina Quintero Ruiz la oportunidad de estudiar y trabajar en su laboratorio, por su paciencia y apoyo, mil gracias.

Manifiesto mi reconocimiento al comité tutorial asignado: Dra. Angelina Quintero Ruiz, Dra. Patricia Ostroski Shejet, Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Por sus apreciaciones, recomendaciones y sobre todo por la atención académica para con éste proyecto de maestría

Agradezco también las valiosas recomendaciones en la presentación por escrito de ésta tesis a los Drs: Rogelio Rodríguez Sotres, Alejandro Zentella Dehesa, Marco Antonio Cerbón Cervantes, José Pedraza Chaverri y Alejandro García Carrancá.

Le agradezco profundamente a todas las personas que dan forma y ánimo a la UNAM, gracias.

A mi familia: Solano Becerra, Becerra Ramírez y a la familia Montufar Serrano. Y muy cariñosamente A mi mamá Elisa y a mi papá José Guadalupe, gracias.

A la Bióloga Rocío Morales por el análisis y asesoría de citofluorometría de flujo.

Al Dr. José Pedraza y Al Dr. Rogelio Rodríguez por la utilización del equipo de espectrofotometría, para la realización del análisis enzimático.

A la Dra. Erika Olivia Gómez y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por el asesoramiento en la determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.

A los Drs. del Lab. 202 de Biología Molecular: Fernando García Tamayo, Marco Antonio Cerbon e Ignacio Camacho. Por su atención y apoyo.

Al M en C Miguel Ángel Martínez Urbina y M en C Miguel Ángel Martínez Vilchis por su ejemplo de esfuerzo y amistad.

A todos mis compañeros del laboratorio 202: Lupita García, Mago, Geno, Elizabet, Adriana, Adriana Jiménez, Anel, Sergio, Ivonne, Carolina, Ignacio, Karina, Ivan Huerta, Susana, Adriana Mendoza, Mauricio, Luciano, Omar, Miguel, Noemí, Olga, Gaby, Christian, Tere, Edith, Tania e Ivan. Por su solidaridad y amistad.

A todos mis compañeros de la carrera de QFB de mi querida ENEP Zaragoza y a todos los compañeros del Cetis 37 de Nezahualcoyotl.

A Lety García y a Ade por su excelente trabajo, no se que haríamos sin Uds.

## **Dedicatorias.**

Le dedico este esfuerzo a mi amor  
Estela Montufar Serrano.  
Quien desde un sueño me eligió.

A mi cuenta-cuentos de ojos maravillosos y verdad completa.  
Andrea Solano Montufar ♥

A mi papá qpd.  
José Guadalupe Solano.  
No tengo palabras para expresar mi sentimiento de gratitud y amor.

A quien me acompaño y a quien acompañe  
caminando por las calles sin pavimento y donde nunca oscureció.  
Elisa Becerra Ramírez.

A mis hermanos: David, Ana Lilia, Carmen, José Guadalupe, Salvador y muy especialmente  
a Juan Manuel.

A mis tíos que son como hermanos: Concepción, Toño, Socorro, Eduardo y especialmente a  
Hilda. Y a la mamá de ellos mi abuelita Margarita.

## Abreviaturas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

akt: Oncogén aislado de tumores producidos por el retrovirus murino AKT8, su producto es la proteína cinasa B (PKB).

ATGs: Genes relacionados en Autofagia (Autophagy Genes).

ATP: Adenosina-5'-trifosfato (adenosine-5'-triphosphate).

Bad: Proteína pro-apoptótica antagonista de Bcl-2 (BCL2-antagonist of cell death protein).

Bak: Proteína pro-apoptótica antagonista de Bcl-2 (BCL2-antagonist/killer 1).

Bax: Proteína X asociada a BCL-2, la X por desconocida en su momento (BCL2-associated X protein).

Bcl-2: Proteína anti-apoptótica, equivalente al gen ced-9 de *C. elegans*, identificada en un linfoma de células B (B cell lymphoma)

bcl-x: Gene relacionado a bcl-2 con un sitio de corte y empalme alternativo que puede originar dos proteínas Bcl-xl (anti-apoptótica) y Bcl-xs (pro-apoptótica).

Bid: Proteína proapoptótica tipo Bcl-2 (BH3 Interacting domain Death agonist).

BimL: Isoforma grande de un mediador de muerte celular que interactúa con Bcl-2 (large bcl-2 interacting mediator of cell death).

Blk: Proteína pro-apoptótica con un solo dominio tipo BH3 (BH3-only protein).

BNIP3: Proteína 3 con dominio BH3 que interactúa con la proteína E1B de 19 KD (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3).

°C: Grados centígrados.

CDK1: Cinasa dependiente de ciclina 1 (Cyclin-Dependent Kinase 1).

c-FLIP: Isoforma larga de la proteína celular inhibitoria de FLICE (cellular FLICE-inhibitory protein, long isoform).

DD: Dominios de muerte (Death Domain).

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte.

D-MEM: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium).

DNAsa: Enzima que degrada al DNA (desoxirribonucleasa).

DS: Desviación estándar.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR).

ERCC1: Proteína 1 que repara la escisión de complementación cruzada (ERCC1).

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas (Fas-associating protein with death domain)

Fas: Receptor de superficie celular que induce apoptosis en unión a su ligando( Surface antigen apo1).

5FU: 5-Fluorouracilo.

GSH: glutation en su forma reducida.

h: Hora

Her2: Receptor de crecimiento epidermal humano 2.

iRNA: ARN de interferencia (Small Inhibitory Antisense RNAs).

LDH: Lactato deshidrogenasa.

MCL-1: Proteína con secuencia relacionada a Bcl-2 de células de leucemia mieloide (myeloid cell leukemia sequence 1 BCL2-related).

min: Minuto

MMR: Reparación por escisión de nucleótidos (mismatch repair).

MRP: Proteína de multi-resistencia a fármacos (MRP).

MTX: Metotrexato (MTX).

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio.

MYT: Proteína cinasa (myelin transcription factor).

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida (Nicotinamide adenine dinucleotide).

NER: Mecanismo de reparación del DNA por escisión de nucleótidos (Nucleotide excision repair).

NF- $\kappa$ B: Factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear Kappa B)

nm: Nanómetros.

PARP: Polimerasa Poli-(ADP-ribosa).

PBS: Solución salina amortiguadora de fosfatos (Phosphate buffer saline).

PBS-EDTA: Solución salina amortiguadora de fosfatos y ácido etilendiamino- tetracético (Phosphate buffer saline-ethylenediaminetetraacetic acid)

P-gp: Glicoproteína P.

PI3K: Cinasa de fosfatidil-inositol 3 (phosphatidylinositol 3-kinase).

PTKs;Cinastas de proteínas en residuos de tirosina.

RFC: Acarreador de folato reducido (Reduced folate carrier).

RIP: Proteína que interactúa con receptores con dominio de muerte (death domain kinase, receptor interacting protein).

RPM: Revoluciones por minuto.

RNAsa: Enzima que degrada ARN (ribonucleasa).

seg: Segundos.

SFB: Suero fetal bovino.

SST: Dominio de unión secuencia-especifica al DNA (Sequence Specific Transactivation).

STAT3: Transductor de señales y activador de la transcripción tipo 3.

TBS: Solución salina amortiguadora de tris (Tris Buffered Saline).

TDX: Tomudex (TDX).

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR).

TUNEL: Técnica de detección de fragmentación de ADN basada en el marcaje de extremos 3' libres de ADN con dUTP marcado con fluoresceína por la enzima desoxinucleotidil transferasa. (Tdt-mediated dUTP Nick End Labeling)

TOR: Blanco de rapamicina (target of rapamycin).

TRADD: Dominio de muerte asociado a TNFR (TNFR-associated via death domain).

TRAIL: Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF(TNF-related apoptosis-inducing ligand).

Tris: Hidroximetilaminometano.

WEE1: Proteína cinasa homologa a Wee1 de *S pombe* (Wee1-like protein kinase 1).

x g: Veces que se aplica la gravedad, unidades de fuerza centrifuga relativa.

## Índice.

	Pag.
1. Resumen.	1
2. Introducción.	2
3. Antecedentes.	4
3.1. Generalidades del cáncer.	4
3.2. Mecanismos de resistencia hacia la quimioterapia.	5
3.3. Tipos de muerte celular.	9
3.3.1. Apoptosis.	9
3.3.2. Autofagia.	12
3.3.3. Oncosis.	14
3.3.4. Catástrofe mitótica.	15
3.3.5. Necrosis.	16
3.4. Chalconas.	16
3.5. Mecanismos de acción propuestos de derivados de chalconas.	18
3.6 Derivados de heterodiariliden-ciclohexanona.	20
4. Hipótesis.	24
5. Objetivo general.	24
6. Objetivos específicos.	24
7. Material y métodos.	25
7.1. Líneas celulares.	25
7.2. Heterodiariliden-ciclohexanonas.	25
7.3. Cultivo de líneas celulares.	25
7.4. Determinación de viabilidad celular e $IC_{50}$ por MTT.	25
7.5. Determinación de viabilidad por cristal violeta.	26
7.6. Determinación de viabilidad por exclusión de azul tripano.	27
7.7. Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo.	27
7.8. Determinación de la fragmentación del ADN por TUNEL.	28
7.9. Detección de la expresión de proteínas por inmunoelectro-transferencia.	29
7.10. Análisis morfológico por tinción con hematoxilina.	30
7.11. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.	30
7.12. Análisis de la inhibición de proteínas de novo en la vacuolización.	31
7.13. Tinción de vacuolas con rojo neutro.	31
7.14. Análisis estadístico.	31
8. Resultados.	32

	pag.
8.1. Los nuevos derivados heterodiariliden-ciclohexanonas inhiben la proliferación en líneas celulares.	32
8.2. La inhibición de la proliferación celular por el compuesto A y B se incrementa en función del tiempo.	35
8.3. La viabilidad celular de HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A, al inicio y al término del tratamiento no son significativamente diferentes.	36
8.4. La inhibición de la proliferación celular en células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A es por un proceso citotóxico.	37
8.5. Las células SW480 tratadas con el compuesto A no presentan fragmentación de ADN.	41
8.6. El compuesto A no altero la expresión de proteínas pro- y anti-apopticas en células HeLa.	42
8.7. El compuesto A induce la liberación del contenido citoplásmico en células HeLa, SW480 y MCF-7.	43
8.8. La citotoxicidad del compuesto A está asociada con formación de vacuolas.	45
9. Discusión.	47
10. Conclusiones.	51
11. Bibliografía.	52.

## 1. Resumen.

El cáncer es una enfermedad genética, surge a partir de mutaciones heredadas o adquiridas que se producen en genes vitales en la regulación del ciclo celular. En México el cáncer ocupa la segunda causa de muerte y uno de los problemas en su tratamiento es la resistencia hacia la quimioterapia. Por lo que la obtención de compuestos que puedan contribuir a un mejor tratamiento del cáncer es relevante.

En los últimos años se ha incrementado el interés de los compuestos de tipo chalcona debido a sus propiedades citotóxicas y antitumorales. Recientemente se han sintetizado nuevas chalconas de tipo heterodiariliden-ciclohexanonas modificadas con dimetiluracilo: **A** (9E)-1,3-dimetil-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-9-[(1-metil-1H-pirrol-2-il)metil-len]-,7,8,9-tetra-hidropirimido[4,5b]quinolin2,4-(1H.-3H)diona, **B** (9E)-1,3-dimetil-5-(1me-til-1H-pirrol-2-il)-9-[(1-metil-1H-pirrol-2-il)-metilen]-6,7,8,9-tetrahidro-2H-pirano-pirido[2,3]pirimidina-2,4(3H)-diona y **C** (9Z)-1,3-dimetil-5-tien-2-il-9-(tien-2-ilme-tilen)-1,6,8,9-tetra-hidro-2H-pirano[3',4'-:5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-2,4(3H)diona. En este trabajo se planteó la evaluación de la actividad citotóxica de éstos compuestos en líneas celulares humanas y su posible mecanismo de acción.

Los nuevos derivados de heterodiariliden-ciclohexanona A y B presentaron actividad evaluada por MTT, con una concentración inhibitoria del 50% de 4.4  $\mu\text{M}$  para el compuesto A en células SW480 y para el compuesto B de 8.7  $\mu\text{M}$  en células MCF-7, el compuesto C resulto inactivo. Los resultados obtenidos para el compuesto A en: citofluorometría de flujo, TUNEL y liberación de LDH; demuestran que su actividad antiproliferativa se debió a un efecto citotóxico, induciendo muerte celular de tipo necrótica asociada a una vacuolización.

## 2. Introducción.

El cáncer es un proceso de múltiples pasos en el cual existen diversas alteraciones en el ADN tales como mutaciones puntuales, deleciones y rearrreglos en los cromosomas. Este tipo de alteraciones en proto-oncogenes y genes supresores tumorales conducen a la ganancia y/o pérdida de sus funciones, respectivamente. Esto lleva a la desregulación de los mecanismos que controlan la proliferación celular, así como la diferenciación celular y muerte celular programada (Weinberg 1989). El cáncer constituye hoy en día un problema de salud pública a nivel mundial, en México ocupa la segunda causa de muerte (Mohar 2000).

El tratamiento del cáncer generalmente se lleva a cabo utilizando radioterapia, quimioterapia ó cirugía, aplicados por separado o combinados. El empleo de la mayoría de los fármacos usados en la quimioterapia provoca efectos secundarios no deseados, a lo que debemos sumar la resistencia que posean ó adquieran los tumores. La resistencia a los fármacos es el principal problema que limita la efectividad de la quimioterapia usada para el tratamiento del cáncer. Las células tumorales pueden presentar intrínsecamente resistencia. Sin embargo, la resistencia a fármacos puede ser adquirida durante el tratamiento a tumores inicialmente sensibles a la quimioterapia. Se estima que la resistencia a los fármacos es la causa de que la quimioterapia no sea efectiva en el 90% de pacientes que presentan cáncer metastásico (Longley y Johnston 2005). Uno de los principales mecanismos de resistencia consiste en la expresión de isoformas de bombas inespecíficas, que permiten expulsar activamente a una gran variedad de fármacos del citoplasma celular. Por lo anterior, la obtención de nuevos compuestos con actividad antitumoral que no muestren resistencia pueden contribuir a un mejor tratamiento del cáncer es relevante.

En los últimos años se ha incrementado el interés en el estudio de las chalconas consideradas como precursores de flavonoides e isoflavonoides, las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en plantas comestibles. Las chalconas químicamente son estructuras que contienen grupos carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Las chalconas presentan múltiples actividades biológicas, tales como: anti-inflamatorias, analgésicas, antipiréticas, antioxidantes y antitumorales (De Vincenso y col 2000).

Diversas chalconas y compuestos relacionados como la 2',5'-dimetoxi-4-hidroxicalcona, resveratrol, baicaleína, flavopiridol y la quercetina han demostrado tener actividad citotóxica *in vitro*, mediante la inducción de muerte celular programada apoptótica (Won y col 2005, Ahmad y col 2001, Ueda y col 2001, Zoya y col 2004 y De Vincenzo y col 2000). La quercetina y algunas chalconas halogenadas, inhiben la actividad de la glicoproteína P (P-gp; Bois y col 1998). La P-gp es una proteína que se sobre-expresa en células tumorales y actúa activamente como bomba inespecífica en la expulsión de fármacos, del citoplasma hacia el exterior de la célula, lo cual está asociado a la resistencia hacia la quimioterapia (Gottesman y col 2002).

La mayoría de las chalconas tienen en un extremo de su grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado uno o varios anillos aromáticos (Figura A), los cambios estructurales han evolucionado con una gran variedad de sustituyentes en dichos anillos. En 1992 se evaluó la actividad citotóxica de las primeras chalconas de tipo heterodiariliden-piperidonas, las (E)-3,5-bis(benciliden)-4-piperidonas en líneas celulares de leucemia, con valores de  $IC_{50}$  de 10  $\mu$ M (Figura A; Dimmock y col 1992).

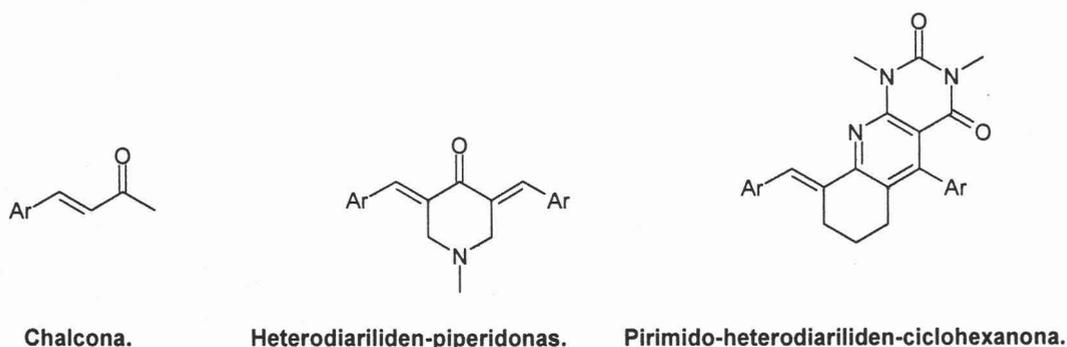


Figura A. Estructuras básicas de chalconas, chalconas simétricas y de derivados pirimidicos de heterodiariliden-ciclohexanona.

Recientemente, se sintetizaron nuevas chalconas de tipo heterodiariliden-ciclohexanonas (Figura A) y de tipo heterodiariliden-piranona (Díaz y col 2003), a las cuales adicionalmente se les incorporó un grupo pirimidico, estos nuevos derivados de diarilidenciclo-hexanonas constituyen una serie de nuevos compuestos, por lo que en este trabajo se planteó la evaluación de la actividad citotóxica de éstos compuestos en líneas celulares humanas y su posible mecanismo de acción.

### **3. Antecedentes.**

#### **3.1. Generalidades del cáncer.**

La proliferación celular así como la muerte celular fisiológica son procesos celulares que están regulados por múltiples genes, algunos de ellos son los denominados proto-oncogenes los cuales también participan en la diferenciación celular. La función de los proto-oncogenes a su vez es regulada por los productos de genes supresores de proliferación como p53 y Rb (retinoblastoma), impidiendo la división descontrolada de las células y el crecimiento de la masa tumoral. Estos diferentes procesos son estrictamente coordinados y regulados en condiciones fisiológicas para mantener la homeostasis celular (Weinberg 1989).

Existen muchas evidencias que sustentan el concepto de que el cáncer es una enfermedad genética que involucra la evolución clonal de células transformadas. En la mayoría de los casos, el cáncer surge a partir de la suma de mutaciones adquiridas (somáticas) y en el menor de los casos de mutaciones heredadas (línea germinal). En ambos casos estas mutaciones se producen en genes cuyos productos parecen desempeñar funciones fundamentales en la regulación; de las cascadas de señalización de factores proliferativos, ciclo celular, diferenciación y muerte celular. Así, en todas las células tumorales y sus tejidos es frecuente encontrar un contenido genético anormal, cambios estructurales en los cromosomas y alteraciones en el ciclo celular. La inestabilidad genética en estas células y la acumulación de mutaciones provocan una ventaja en la proliferación de la célula transformada, lo cual le permitirá dominar sobre su contraparte normal (Barrera y De la Garza 2000).

Desde el punto de vista clínico, el cáncer es un término genérico que comprende muchas enfermedades que tienen en común la proliferación celular sin restricciones de una clona con capacidad de dañar y alterar los tejidos sanos con los que interacciona y/o la capacidad de diseminarse a distancia. Por lo tanto, no existe una manifestación típica de cáncer, sino que las manifestaciones reflejan la localización del tumor en determinado órgano o sistema, o los efectos que se producen a distancia debido a la presencia de las metástasis o a los efectos de los compuestos secretados por el tumor que repercuten en la función de otros órganos.

El INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática) informó que en México en el 2002 las defunciones por tumores malignos representaron 11.2% del total de fallecimientos en los varones y 14.7% en las mujeres (México en corto INEGI 2005). En un reporte este organismo dio a conocer información referente a la mortalidad y morbilidad de la población mexicana por tumores malignos, con base en los egresos hospitalarios por este tipo de padecimientos. En el reporte "México en corto", se registró que en el 2002 se atendieron 70,745 mujeres y 54,228 hombres por algún tumor maligno. El reporte señala que de cada 100 egresos hospitalarios femeninos por tumores malignos, 32% de casos correspondieron al de cuello del útero, 33% al de mama, 17% a leucemias y 5% al cáncer de tráquea, bronquios y pulmón. En los varones 44.4% de los egresos se debe al de leucemia, 23.9% al cáncer de tráquea, bronquios y pulmón, 14.3% al de estómago y 10% por el de colon. (México en corto INEGI 2005).

La resistencia a los fármacos es uno de los principales problemas que limita la efectividad de la quimioterapia contra el cáncer. Los tumores pueden ser resistentes a la quimioterapia al inicio del tratamiento; sin embargo, la resistencia puede adquirirse durante el tratamiento. Una propiedad de la resistencia adquirida es que los tumores no únicamente se hacen resistentes al fármaco originalmente usado, sino que pueden desarrollar resistencia cruzada hacia otros fármacos aun cuando sus mecanismos de acción sean diferentes (Longley y Johnston 2005).

### **3.2. Mecanismos de resistencia hacia la quimioterapia.**

Los mecanismos de transporte de los fármacos hacia el exterior de la célula aún no se conocen en su totalidad. Sin embargo, se ha establecido por ejemplo que inhibidores de la vía del folato como el metotrexato (MTX), inhibidor de la dihidrofolato reductasa y el tomudex (TDX), inhibidor de la timidilato síntasa, se introducen a la célula principalmente vía el acarreador de folato reducido (RFC), la disminución de la expresión de RFC y su inactivación por la presencia de mutaciones son mecanismos reportados de resistencia al metotrexato (Guo y col 1999). La expresión de proteínas transportadoras ó bombas inespecíficas tipo ABC (ATP Binding Cassette) en las células tumorales, se ha asociado a una expulsión activa del fármaco, del citoplasma al exterior de la célula tumoral. Ejemplos de estas proteínas son la glicoproteína P (P-gp) y la proteína de multi-resistencia a fármacos (MRP) (Gottesman y col 2002). Particularmente los blancos de estas bombas

son fármacos hidrofóbicos tales como: taxanos, antraciclinas y alcaloides de la planta *Catharantus roseus* (vinca). El inhibidor de la topoisomerasa I (topo-I) irinotecan, así como su metabolito activo SN-38, también son blancos para bombas tipo ABC al igual que el cisplatino y el metotrexato (Thomas y Coly 2003). La multi-resistencia a fármacos ha sido ligada a la sobre-expresión de la glicoproteína P-gp, la cual se ha encontrado sobre-expresada en muchas líneas celulares resistentes a fármacos y en diversas leucemias y tumores sólidos (Thomas y Coly 2003), lo cual ha llevado a la búsqueda de inhibidores de P-gp y de otras proteínas transportadoras.

La cantidad de fármaco disponible dentro de la célula puede ser alterada por medio de distintos mecanismos. Se ha encontrado que más del 80% del anti-metabolito 5-fluorouracilo (5FU) es normalmente catabolizado por la dihidropirimidina deshidrogenasa principalmente en el hígado (Diasio y Harris 1989). La sobre-expresión de esta enzima se ha demostrado *in vitro* en líneas celulares la cual confiere resistencia hacia el 5FU (Takabe y col 2001). El glutatión (GSH) es un poderoso antioxidante, el cual ayuda a inhibir el estrés oxidativo, los fármacos del platino pueden estar covalentemente ligados al GSH y el complejo resultante es sustrato para proteínas transportadoras ABC, promoviendo la salida del fármaco. La inactivación de fármacos del platino puede también ocurrir por unión a metaloproteínas, el irinotecan puede ser inactivado por enzimas de citocromos P450 y su metabolito activo SN-38 es blanco de glucoronación por la difosfogluconosil uridina transferasa (Xu y Villalona-Calero 2002)

Alteraciones en la expresión o mutaciones de blancos de fármacos antitumorales también pueden contribuir en la resistencia. El metabolito del 5FU el fluorodesoxiuridín monofosfato es un potente inhibidor de la timidilato sintasa y su inhibición se piensa es la principal actividad antitumoral del 5FU, estudios preclínicos han demostrado que la expresión de la timidilato sintasa es un determinante clave de la sensibilidad hacia el 5FU. Así mismo estudios de inmunohistoquímica y de RT-PCR demostraron que una expresión disminuida de timidilato sintasa correlaciona con una mayor sensibilidad al 5FU (Johnston y col 1995). Tanto el irinotecan como su metabolito activo SN-38 son potentes inhibidores de la topo-I. Se ha encontrado disminución en la expresión del ARNm de la topo-I en líneas celulares de cáncer de colon resistentes al irinotecan. La topoisomerasa-II, indispensable en la replicación del ADN, es blanco de antraciclinas como doxorubicina y de epipodofilotoxinas como el etoposido, de forma similar a los efectos del irinotecan se

han encontrado mutaciones ó disminución de la topo II en líneas celulares resistentes a fármacos cuyo blanco es la topo-II (Deffie y col 1992). Por otro lado, los microtubulos constituyen el blanco para taxanos como el taxol y el docetaxel y alcaloides de la planta *Catharantus roseus* como la vincristina y vinblastina. Estos compuestos suprimen la dinámica de polimerización de los microtubulos lo cual resulta en una disminución en la velocidad de la mitosis o en su bloqueo. El nivel de polimerización y la dinámica de los microtubulos son regulados por varios factores incluyendo la expresión de diferentes isotipos de tubulina, la dinámica de los microtubulos y los niveles de los isotipos de tubulina. Cambios en todos estos factores se han correlacionado con la resistencia al taxol y a los alcaloides antes mencionados (Burkhart y col 2001).

La reparación por escisión de nucleótido (NER) es la principal vía para la remoción de aductos de platino-ADN. Tanto los aductos de ADN inducidos por oxaliplatino y cisplatino son removidos con similar eficiencia por NER (Reardon y col 1999). NER es un complejo proceso que involucra al menos 17 proteínas diferentes; sin embargo, la sobre-expresión de algunos componentes limitantes del sistema NER son necesarios para incrementar su eficiencia. Uno de estos importantes factores limitantes es la proteína 1 que repara la escisión de complementación cruzada (ERCC1), la cual en varios estudios preclínicos ha demostrado tener un importante papel en la determinación de sensibilidad al cisplatino, ya que un incremento en la expresión de ERCC1 está asociado a la resistencia al cisplatino (Youn y col 2004). Por otro lado, datos experimentales relacionan deficiencias del sistema de reparación de apareamientos incorrectos o sistema MMR (MisMatch Repair) con el desarrollo de resistencia, a un amplio rango de agentes que dañan al ADN, incluyendo los fármacos que contienen platino ya que se ha visto que *in vitro* células deficientes de uno de los genes de este sistema de reparación como el *hMLH1*, muestran resistencia al cisplatino (Brown y col 1997).

El propósito de la quimioterapia citotóxica es la de inducir la muerte de células tumorales. La apoptosis es la muerte celular más estudiada, se inicia mediante su activación que es regulada por señales externas o internas, continua con la amplificación de estas señales por segundos mensajeros y la activación de caspasas efectoras de la apoptosis. Las principales vías de activación de las caspasas, se presentan por medio de dos vías; la vía intrínseca es regulada por proteínas de la familia de Bcl-2 y la vía extrínseca es regulada por miembros de la superfamilia de receptores del factor de

necrosis tumoral (TNFR). En el caso de miembros de la familia de Bcl-2 estudios *in vitro* han demostrado que la sobre-expresión de Bcl-2 inhibe la muerte celular inducida por diversos agentes (Miyashita y Reed 1992). Mientras que la sobre-expresión de Bax sensibiliza a las células cancerosas a la muerte inducida por quimioterapia (Sakakura y col 1997). La apoptosis mediada por receptores puede ser inhibida por receptores señuelo (DcR decoy receptors), DcR3 en el caso de Fas y DcR1 y DcR2 en el caso de receptores TRAIL. Los receptores señuelo se unen a FasL/TRAIL pero carecen del dominio intracelular necesario para la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC) inhibiendo la activación de muerte celular (Ashkenazi 2002). La apoptosis mediada por FAS y DR4/DR5 puede ser inhibida también por factores citoplasmáticos, el más conocido es c-FLIP el cual se une a DISC inhibiendo la activación de la caspasa 8. Se ha encontrado que la inactivación de C-FLIP con ARN de interferencia (iRNA) sensibilizó a líneas celulares de cáncer de colon hacia el 5FU, oxaliplatino e irinotecan. También se ha demostrado que la sobre-expresión de c-FLIP inhibe la apoptosis mediada por receptores (Srinivasula y col 1997). Otro importante nivel de regulación de la apoptosis es a través de la inhibición de la actividad de las caspasas por proteínas de la familia inhibidoras de la apoptosis (IAPs) las cuales pueden unirse directamente a las caspasas tales como la 3, 7 y 9. La sobre-expresión de la survivina, una de las IAPs, se ha encontrado que ocurre en paralelo con la inhibición de la apoptosis inducida por agentes antitumorales *in vitro* (Tamm y col 1998). Por otro lado, una de las proteínas más estudiadas que inducen apoptosis y que regula el ciclo celular es P53, esta proteína aparece frecuentemente mutada en aproximadamente el 50% de los distintos tipos de cáncer. P53 es considerada como uno de los principales supresores tumorales, se le han dedicado numerosos reportes que indican que la disminución de su funcionalidad contribuye a la resistencia hacia los fármacos, atribuida a la incapacidad de las células de inducir apoptosis dependiente de P53 (Longley y Johnston 2005).

Las cinasas de proteínas en residuos de tirosina (PTKs) tienen un impacto en la resistencia a los fármacos a través de la regulación de las vías de transducción de señales anti-apoptóticas, tanto el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) como el receptor de crecimiento epidermal humano 2 (Her2) también han sido implicados en la progresión de tumores en humanos, en donde se observa la sobre-expresión o mutaciones oncogénicas de estos receptores. La sobre-expresión *in vitro* de EGFR Y Her2 ha sido relacionada con el incremento a la resistencia de agentes quimioterapéuticos

(Pegram y col 1997). Se ha reportado que la activación de la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K) a través de EGFR y su ligando se relaciona con el incremento en la quimioresistencia debido a que PI3K genera el lípido fosfatidil-3,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>) el cual transloca a Akt hacia la membrana plasmática donde es activada y fosforilada por la cinasa 1 dependiente de fosfoinositol-3 (PDK-1). Akt fosforila y regula la función de muchas proteínas incluidas proteínas reguladoras de apoptosis como Bad (Nicholson y Anderson 2002). Por otro lado, se ha demostrado que la sobre-expresión de Bcl-2 dependiente de STAT3, (transductor de señales y activador de la transcripción tipo 3) inhibe la apoptosis inducida por la quimioterapia en células de cáncer de mama (Real y col 2002) y se ha demostrado que la inhibición de STAT3 aumenta la sensibilidad de células de cáncer de cabeza y cuello hacia el 5FU (Masuda y col 2002). Así mismo, una actividad incrementada del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (factor nuclear Kappa B) en pacientes con cáncer de esófago ha sido asociada con una respuesta reducida hacia la quimioterapia y radioterapia (Abdel-Latif y col 2004).

### **3.3. Tipos de muerte celular.**

La omisión o represión de muerte celular tiene un doble impacto en oncología. 1°) La inhabilitación de los principales mecanismos de transducción de señales de muerte celular y/o supresión de los programas bioquímicos involucrados en la ejecución de la muerte celular, pueden tener un papel fundamental en el proceso de oncogénesis. La resistencia a la muerte permite la selección "darwiniana" de clonas cuya necesidad vital hacia factores de crecimiento externo, nutrientes así como la autonomía de células tumorales, se incrementa y las habilita para extenderse y producir metástasis. 2°) La terapia convencional con agentes antitumorales o radiaciones ionizantes induce la muerte de células tumorales, usualmente por activación de un programa bioquímico latente de muerte. Sin embargo, después de una respuesta inicial a la terapia, células tumorales resistentes escapan de la muerte celular (Kroemer 2004). Los tipos de muerte reportados más frecuentemente se describen a continuación.

#### **3.3.1. Apoptosis.**

La apoptosis se diferencia de la muerte de tipo necrótica debido a que durante la apoptosis el contenido celular se mantiene dentro de membranas, mientras que en la

necrosis la célula estalla liberando su contenido el cual puede ser perjudicial para el organismo (Hirsch y col 1997). Las características de la apoptosis son reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, fragmentación del ADN (Lowe y Lin 2000), pérdida de la función mitocondrial (Constantini y col 2000, Reed y col 1998) y exposición de la fosfatidilserina en el lado exterior de la membrana citoplasmática (Fadok y col 2000). Por otra parte, las células muertas son fagocitadas rápidamente, por lo que las células apoptóticas al contrario de las necróticas no inducen reacciones inflamatorias (Reiter y col 1999).

El estudio de los genes que afectan la muerte celular por apoptosis en el nematodo *Caenorhabditis elegans* llamados *ced* (*C. elegans* death) estimuló la búsqueda de sus homólogos mamíferos (Woo y Mak 1998) y mostraron que es un mecanismo conservado a lo largo de la evolución (Jacobson y col 1997). La apoptosis es dependiente de energía (Constantini y col 2000) y puede ser suprimida por inhibidores de la síntesis de proteínas o ARN (Sen y D'Incalci 1992). La apoptosis se lleva a cabo en varias etapas: La fase de iniciación que es muy heterogénea, la fase de decisión y la de degradación o ejecución (Constantini y col 2000).

La fase de iniciación de la apoptosis puede ser causada por señales extrínsecas, debido a la presencia de receptores o por señales intrínsecas para eliminar células con daño metabólico o al ADN.

La apoptosis por factores extrínsecos está mediada por receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF; Ashkenazi y Dixit 1998). Los más estudiados en este grupo incluyen a los receptores TNF-R1 y Fas. Estos receptores al unir su ligando se trimerizan a través de dominios de muerte (DD), después de la trimerización se unen proteínas asociadas al dominio de muerte (TRADD o RIP para TNF y FADD para Fas), las cuales contienen dominios efectores de muerte (DED) (Ashkenazi y col 1998). La procaspasa-8 se une a las proteínas asociadas al DD por el DED y se activa por medio de una autoproteólisis (Hofmann 1999 y Hengartner 2000). Posteriormente, la caspasa 8 activa a la caspasa 3.

La vía intrínseca es iniciada por varios estímulos de estrés tanto extracelulares como intracelulares, tales como ausencia de factores de crecimiento, hipoxia, daño al

ADN y por inducción oncogénica (Lowe y Lin 2000), esta vía conduce a eventos bioquímicos que resultan en la permeabilización de la membrana de la mitocondria (Hengartner 2000).

La proteína P53 es un factor de transcripción que participa en importantes funciones en apoptosis y ciclo celular. Estructuralmente posee tres dominios: el dominio amino terminal o de transactivación de la transcripción, el dominio de unión secuencia-específica al ADN (SST) y el dominio carboxilo terminal que es el responsable de la tetramerización, de la localización nuclear y del reconocimiento de daño al ADN.

La proteína P53 regula el ciclo celular suspendiendo su avance en la fase G1, por inducción del gen p21waf/cip1, que inhibe a las cinasas dependientes de ciclinas. También decide cuando la célula debe ir a apoptosis y esta decisión está influenciada por el tipo celular, la composición oncogénica, los estímulos extracelulares, la intensidad del insulto a la célula, los niveles de expresión de P53 y su interacción con otras proteínas reguladoras (Sionov y Haupt 1999).

La proteína P53 regula genes que codifican para proteínas de la familia de bcl-2, que participan en la apoptosis. Esta familia de proteínas se divide en pro-apoptóticos (Bax, Bak, Box, Bcl, Blk, Hrk, Bcl-xs, BNIP3, BimL, Bad y Bid) y en anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, MCL-1 y A1). Estos genes regulan la muerte celular dependiendo de la relación de la expresión de proteínas apoptótico/antiapoptótico de esta familia. Se piensa que estas proteínas forman homodímeros y heterodímeros entre ellos. De esta forma cuando la relación de Bax/Bcl-2 es menor a 1 se encuentran homodímeros Bcl-2/Bcl-2 en forma mayoritaria y la célula sobrevive, pero si la razón Bax/Bcl-2 es mayor a 1 se producen más homodímeros Bax/Bax y la célula muere.

La proteína Bcl-2 está localizada en las membranas del retículo endoplásmico, en la membrana nuclear y en la membrana externa de la mitocondria, mientras que Bax es citosólica. El mecanismo de Bax parece relacionarse con su capacidad para formar canales en membranas lipídicas. Bax puede presentarse en forma monomérica u oligomérica, siendo esta última la que es capaz de formar canales. Posteriormente a un estímulo apoptótico, previa dimerización, Bax se transloca a la mitocondria (Groos y col 1998).

Bcl-2 está relacionada con el mantenimiento de la función de la mitocondria. La sobre-expresión y translocación de Bax a la mitocondria está relacionada a la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y dependiendo de la intensidad de esta, la célula puede morir por necrosis o apoptosis (Hirsch y col 1997). La transición de la permeabilidad es causada por un decremento en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) que puede estar relacionado con el hinchamiento de la mitocondria y la falla del intercambio de ADP por ATP con la subsiguiente disminución del  $\Delta\psi$  y liberación de citocromo C de la mitocondria. Posteriormente el citocromo C se une a Apaf-1 lo cual causa la activación de la pro-caspasa 9 (Hengartner 2000).

Las caspasas son cisteín-proteasas que se encuentran como zimógenos, que una vez procesadas da origen a un dominio p20 y una sub-unidad catalítica pequeña p10. Las caspasas 8 y 9 procesan a la procaspasa 3 para activarla y la procaspasa 3 procesa otras proteínas para activarlas o inactivarlas, entre estas se encuentra la DNAsa, lamininas nucleares, proteínas del citoesqueleto como fodrina y gelsolina, PARP (polimerasa de poli-ADP ribosa) y PAK2 (cinasa activada por P21 tipo 2). Esta serie de degradaciones son las que causan los efectos bioquímicos y la morfología característica de la apoptosis (Hengartner 2000). Las caspasas pueden ser inhibidas por péptidos de la familia de las serpinas, así como proteínas de la familia IAPs (proteínas inhibidoras de la apoptosis).

Una integración entre la vía extrínseca y la intrínseca está situada en la participación de la proteína Bid, ésta una vez que ha sido activada por la caspasa 8, se transloca en la membrana interna de la mitocondria y promueve la salida de citocromo C (Hengartner 2000).

### **3.3.2. Autofagia.**

La autofagia está caracterizada por la formación de vesículas que contienen citoplasma y organelos celulares, cuyo contenido es degradado por el sistema lisosomal. La autofagia se presenta normalmente en la mayoría de las células eucariotas y tiene múltiples funciones fisiológicas en organismos multicelulares incluyendo degradación de proteínas y recambio de organelos, para aprovechar las moléculas resultantes de dicha

degradación en ausencia de nutrientes. Las células que sufren una excesiva autofagia mueren sin presentar morfología apoptótica.

Aunque la morfología de la autofagia fue descrita primero en células de mamíferos, la mayoría de los genes relacionados con autofagia (ATGs) fueron identificados en levaduras, 16 genes han sido reportados y varios de ellos están conservados en otros organismos (Levine y Klionski 2004). En las levaduras la principal función de la autofagia es mantener la supervivencia durante la escasez de nutrimentos, mediante el catabolismo de componentes intracelulares y la eliminación de organelos dañados (Huang y Klionski 2002). En la autofagia las vesículas autofágicas o autofagosomas están formadas por membranas dobles o múltiples, que generalmente se originan del retículo endoplásmico; las cuales engloban organelos y/o proteínas para su degradación.

El autofagosoma encapsula el material citosólico, posteriormente se acopla y fusiona con lisosomas u otras vacuolas, causando la degradación del contenido del autofagosoma. A nivel molecular, la vía de señalización que lleva a la autofagia al menos involucra las actividades de la fosatidilinositol-3 cinasa (PI3K) y de la cinasa blanco de la rapamicina (TOR). La actividad de la PI3K-clase III es particularmente importante para las fases tempranas de la formación de la vesícula autofágica, mientras TOR regula negativamente la formación de autofagosoma y su expansión. Consecuentemente, la inhibición de TOR por rapamicina bloquea la progresión del ciclo celular (Rohde col 2001) y eventualmente induce autofagia (Noda y Ohsumi 1998). La vía de TOR asimismo coordina las señalizaciones que son iniciadas por factores nutricionales y mitogénicos y también controla la síntesis y la degradación de proteínas (Okada y Mak 2004).

Recientemente se ha demostrado que los mecanismos moleculares de la autofagia pueden ser inducidos por una forma alternativa de muerte celular programada independiente de caspasas, en algunos casos apoptosis y autofagia se han visto interconectados positiva o negativamente, involucrando el concepto de "switches moleculares" entre ambas muertes (Boya y col 2005).

La transformación maligna de las células se ha encontrado asociada con supresión o disminución de autofagia. La reciente implicación de deficiencias de supresores tumorales como Beclin 1 (proteína que interactúa con Bcl-2), DAPk (proteína cinasa

asociada a muerte) y PTEN (proteína tirosin fosfatasa) en vías autofágicas, indican un posible papel de las deficiencias en la autofagia en la formación de cáncer. La inducción de muerte celular autofágica por algunos agentes anticancerígenos remarca la potencial utilidad de su inducción como una nueva forma de tratamiento (Gozuacik y Kimchi 2004).

### 3.3.3. Oncosis.

Se ha descrito otro tipo de muerte celular menos conocida. La oncosis, en la que estímulos nocivos e isquemia inducen muerte celular sin características de apoptosis. El término oncosis derivado de "onkos" que significa "hinchamiento" o aumento de volumen, fue propuesto en 1910 por Von Reckling-Hausen para describir muerte celular por isquemia en osteocitos y fue reintroducido recientemente para describir una forma de muerte celular distinta a la apoptosis (Trump y col 1997).

Las células oncóticas son caracterizadas por hinchamiento celular, hinchamiento de organelos, e incremento en la permeabilidad de la membrana. La oncosis usualmente ocurre rápidamente después de la aplicación del insulto a la célula, resultando en cambios en la forma y volumen celular. En cultivos celulares en monocapa, las células oncóticas forman una especie de burbujeo citoplásmico y agrupamiento en racimos de la cromatina, seguido de una alteración y una reagrupación celular después de despegarse del fondo de la placa de cultivo (Phelp y col 1989). La muerte celular oncótica ha sido documentada en macrófagos infectados con *Shigella flexneri* (Fernández-Prada y col 1997), en células de melanoma B16 murina tratadas *in vivo* con ciclofosfamida (Kuwashima y col 1996), en linfocitos de sangre periférica tratados con altas dosis de toxina de estafilococos (Jonas y col 1994). El mecanismo molecular y bioquímico de oncosis aun no se ha aclarado. Se cree que la oncosis es el resultado de una falla en bombas iónicas en la membrana plasmática que disminuye los niveles celulares de ATP (Eguchi y col 1997). Recientemente se ha documentado que la fosfolipasa A<sub>2</sub> está relacionada a los procesos de daño en la membrana celular y a cambios en la estructura de ésta (Cummings y col 2000; Sapirstein y Bonventre 2000). En estudios donde se clonó al receptor de membrana porimina; al reaccionar con el anticuerpo anti-porimina indujo muerte celular con características de oncosis, sin fragmentación de ADN ni cuerpos apoptóticos (Zhang y col 1998).

### 3.3.4. Catástrofe mitótica.

El término catástrofe mitótica fue originalmente acuñado por Paul Russell y Paul Nurse, al describir la muerte de *Schizosaccharomyces pombe*, células que son forzadas a entrar a mitosis prematuramente debido a la sobre-expresión de Cdc2 (Russell y Nurse 1986). Recientemente, la definición de catástrofe mitótica se ha ampliado para explicar el tipo de muerte de células de mamíferos que es causada por una mitosis defectuosa. La catástrofe mitótica esta asociada con la formación de micronúcleos, células gigantes que contienen cromosomas sin condensar y su morfología es distinta también a la de apoptosis.

En células somáticas normales, en la fase M del ciclo celular se presentan dos procesos consecutivos, la mitosis y la citocinesis. La mitosis se divide en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La entrada hacia mitosis desde la fase de G2 es llevada a cabo por la activación de CDK1, previo a la mitosis CDK1 es llevada en un estado inactivo por fosforilación, la cual es mediada por las cinasas WEE1 y MYT (Nigg 1995). Sin embargo, después de la activación por la fosfatasa, CDC24C, CDK1 fosforila un gran número de sustratos que promueven la ruptura de la envoltura nuclear, separación del centrosoma, ensamblaje de uso mitótico y condensación de cromosomas (Kimura y col 1998). Hacia el final de una mitosis normal, la CDK1 es de nuevo fosforilada e inactivada para que la citocinesis pueda proceder (Noton y Diffley 2000).

El punto de restricción en G2 del ciclo celular es responsable del bloqueo en mitosis, cuando en una célula persiste un daño en el ADN, éste activa un número de moléculas que promueven actividades celulares tales como detención del ciclo celular, reparación del ADN o apoptosis. Sin embargo, si el punto de restricción de G2 se encuentra defectuoso, una célula puede entrar en mitosis prematuramente, antes de que la replicación sea completada o el daño al ADN haya sido reparado, este tipo de mitosis causa que la célula muera por catástrofe mitótica. Agentes que dañan a los microtubulos e interfieren con la formación del uso mitótico también causan catástrofe mitótica (Jordan y col 1996), el taxol induce en líneas celulares una metafase anormal en las cuales las cromátidas hermanas tienden a segregarse inadecuadamente, resultando en una mitosis aberrante y posteriormente mueren, esta muerte propiamente no es de tipo apoptótica

pero esta acompañada con rasgos apoptóticos, como fragmentación de ADN, y formación de cuerpos apoptóticos (Jordan y col 1996).

### **3.3.5. Necrosis.**

En contraste con la muerte celular apoptótica, la necrosis es un proceso desordenado y no regulado que conduce a una destrucción celular traumática, la cual es seguida por la liberación de componentes intracelulares. Algunas características morfológicas de la necrosis incluyen distorsión de la membrana celular, degradación de organelos, aumento de volumen y en algunas ocasiones vacuolización. La necrosis es usualmente consecuencia de una condición patofisiológica, tales como infección, inflamación o isquemia. El trauma resultante causa un extenso daño de vías fisiológicas normales que son esenciales para el mantenimiento homeostático, tales como la regulación del transporte iónico, la producción de energía y el balance de pH. La necrosis es un proceso pasivo poco conocido a nivel bioquímico y molecular, sin embargo actualmente esta siendo más estudiado a este nivel (Okada y Mak 2004).

Las muertes celulares distintas a la apoptosis tales como autofagia y muerte celular de tipo citoplásmica se han observado en etapas tempranas del desarrollo, (Schweichel y Merker 1973; Clark 1990). Así como la muerte celular de tipo neurodegenerativo como la que muestra un modelo de ratón transgénico de esclerosis amiotrófica lateral (Dal Canto y Gurney 1994) y algunas muertes celulares relacionadas a isquemia caracterizadas por "hinchamiento" celular, referidas como oncosis (Majno y Joris 1995) se mantienen sin aclarar. El entendimiento de los mecanismos moleculares de estas formas de muerte tiene implicaciones en el desarrollo de terapias para el cáncer y el diseño de nuevos agentes terapéuticos en donde estas formas diferentes de muerte celular están involucradas.

### **3.4. Chalconas.**

Las chalconas químicamente son estructuras que abarcan un grupo muy amplio de compuestos con estructuras muy variadas que contienen grupos carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados unidos a anillos aromáticos (Figura 1). Estos productos son abundantes en la

naturaleza. Una de las fuentes naturales es la planta *Scutellaria barbata*. Las chalconas y sus derivados tienen múltiples actividades biológicas, las cuales incluyen actividad quimiopreventiva, antitumoral, antiinflamatoria, analgésica, antipirética, antiparasitaria y antioxidante (De Vincenzo y col 2000. Harborne y Williams 2000). Químicamente son consideradas como flavonoides de cadena abierta, en los cuales uno o dos anillos aromáticos están unidos por un sistema carbonilo  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de tres carbonos (Ducki y col 1997).

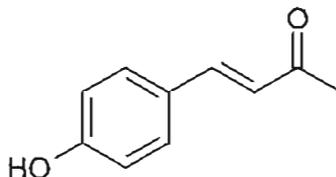


Figura 1. (E)-1-(4'-hidroxifenil)but-1-en-3-ona.

Las chalconas y compuestos relacionados a ellas como los flavonoides contribuyen al color de las plantas, dan protección contra la radiación ultravioleta, funcionan como fungicidas e insecticidas, juegan un papel importante en la fijación de nitrógeno en asociación mutualista entre bacterias del genero *Rhizobium* en la familia de plantas *Leguminosae* (Harborne y Williams 2000). Los flavonoides y chalconas están presentes en una amplia variedad de frutos y vegetales que los humanos utilizan en su dieta. Son también componentes mayoritarios de una gran variedad de plantas utilizadas como agentes antiinflamatorios y diuréticos en la medicina tradicional de algunos países orientales (Ducki y col 1997; Harborne y Williams 2000).

En la medicina tradicional china es usado el extracto seco de la planta *Scutellaria barbata* como un agente antiinflamatorio, antidiurético y antitumoral (Ducki y col 1997) y de esta planta fue aislada la cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada (E)-1-(4'-hidroxifenil)but-1-en-3-ona (Figura 1) que al ser evaluada *in vitro* hacia la línea celular tumoral K562 mostró una actividad citostática con una  $IC_{50}$  de 60  $\mu$ M (Ducki y col 1996).

Después del aislamiento de este compuesto ha sido utilizado como una molécula base para desarrollar otros compuestos con mayor actividad biológica, como el compuesto (E)-1-(pentafluorofenil) but-1-en-3-ona que presentó una  $IC_{50}$  de 1.9  $\mu$ M y 30 veces más activo que el mostrado por el compuesto natural de la figura 1 (Ducki y col. 1997).

La 3'-metil-3-hidroxichalcona inhibió la proliferación de diversas líneas celulares tales como; HGC-29 de cáncer gástrico, HeLa de carcinoma de cérvix, PANC-1 de carcinoma pancreático y GOTO de neuroblastoma, en la línea HGC-29 indujo un retardo en la fase S manteniendo un bloqueo en la fase G0/G1 del ciclo celular, también demostró inhibir la unión del [6,7-<sup>3</sup>H]-estradiol al receptor de estrógeno tipo-II de manera dosis dependiente y alteró la síntesis de proteínas, actividades que explican la inhibición de la proliferación celular. Además la 3'-metil-3-hidroxichalcona presenta actividad biológica *in vivo* suprimiendo la actividad promotora del 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato sobre la carcinogénesis de piel en ratones tratados inicialmente con el 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (Satomi 1993). Los flavonoides: chalcona, 2-hidroxichalcona y la quercetina presentes en la dieta, también han mostrado inducir un efecto inhibitorio sobre la carcinogénesis oral de ratas inducida por el compuesto oxido de 4-nitroquinolina, resultando en una reducción en la frecuencia de carcinomas de lengua en un 68% (Makita y col 1996).

### **3.5. Mecanismos de acción propuestos de derivados de chalconas.**

Una serie de chalconas fue evaluada como agentes antimitóticos y de esta serie el compuesto (E)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-[4-(dimetilamino) fenil]-2-metil-2-propen-1-ona resultó ser un agente antimitótico muy efectivo a una concentración de 4 nM en un sistema *in vitro* y además posee actividad antitumoral *in vivo* (Edwards y col 1990). Estudios posteriores revelaron que la actividad citotóxica de algunas chalconas correlaciona con su capacidad para unirse a la tubulina. Estos compuestos mostraron su unión a la tubulina de manera competitiva con la colchicina, coincidiendo con un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular consistente con una alteración del uso mitótico por la interacción de la chalcona con la tubulina, lo que origina un patrón difuso en la organización de los microtúbulos indicativo de dímeros de tubulina dispersos y despolimerizados (Lawrence y col 2000).

Los derivados halogenados de chalconas han demostrado tener actividad manifestando una unión a la glicoproteína-P con gran afinidad en el rango nM (Bois y col 1998) y en fechas recientes otros derivados mostraron potenciar la citotoxicidad de la daunorubicina en células K562 multirresistentes. Estos compuestos en particular la quercetina también fueron capaces de incrementar la acumulación intracelular de

rodamina 123, una molécula fluorescente que actúa como marcador para demostrar multirresistencia dependiente de Glicoproteína-P (De Vincenzo y col 2000). En fechas recientes se ha observado que algunos derivados de las chalconas presentan actividad en líneas celulares multirresistentes a fármacos en el rango  $\mu\text{M}$  (De Vincenzo y col 2000). Un ejemplo son las 2'-aminochalconas, compuestos que mostraron tener actividad citotóxica *in vitro*, en la línea celular multirresistente KB-VIN la cual sobre-expresa a la glicoproteína P (Xia 2000).

Estudios previos han indicado que la carcinogénesis originada por hidrocarburos aromáticos policíclicos, inducen modificaciones al ADN y a otras macromoléculas. En el metabolismo de estos hidrocarburos policíclicos participan al menos dos reacciones de mono-oxigenación, catalizadas por una o más formas de citocromo P450, éstas activan metabólicamente un gran número de pro-carcinógenos a intermediarios reactivos que interactúan con nucleófilos celulares y finalmente promueven la carcinogénesis (Guengerich 1988). Se ha demostrado que algunas chalconas y sus derivados son potentes inhibidores de las enzimas del CYP1A *in vitro*, cuya inhibición correlaciona con los efectos quimiopreventivos de estos compuestos *in vivo*.

El supresor de tumores MDM2 (Mouse Double Minute 2) regula a la proteína P53 al unirse a su dominio de transactivación e induce a la degradación de ésta por ubiquitinación. El gen de P53 es inactivado en muchos tumores humanos, ya sea por mutaciones o por la unión a proteínas oncogénicas como MDM2. En algunos tumores, tales como el sarcoma de tejido blando la sobre-expresión de MDM2 inactiva a P53, afectando el papel de P53 en la regulación del ciclo celular, permitiendo que progrese el ciclo celular de células con defectos en su ADN defectuosas. La pérdida de las interacciones MDM2/P53 incrementan los niveles de P53 y restauran la actividad transcripcional de esta proteína, lo que indica un potencial terapéutico de moléculas antagonistas de la unión MDM2/P53. Se ha demostrado que algunas chalconas (1,3-difenil-2-propen-1-onas) son inhibidores de la actividad de MDM2 al unirse al sitio de unión de P53, estos compuestos interaccionan con el complejo proteico MDM2/P53, liberando P53 para que pueda ejercer sus diversas funciones, por lo que podrían ser utilizados en terapias contra tumores con niveles elevados de MDM2 (Stoll 2001). Las chalconas derivadas de ácido borónico también han mostrado inhibir la actividad de

MDM2 y son de interés particular ya que su actividad antiproliferativa puede diferenciar entre células normales y tumorales, siendo de 6 a 9 veces menos tóxicas para las normales a concentraciones  $\mu\text{M}$  (Kumar 2003).

En estudios epidemiológicos se ha ligado el desarrollo del cáncer pancreático con una alimentación alta en grasas especialmente con ácidos grasos insaturados, tales como el ácido linoléico y el ácido araquidónico que están presentes en el aceite de maíz y los cuales promueven carcinogénesis (Fay y col 1997). Uno de los factores que está relacionado en el origen de este tipo de cáncer, es la participación de lipoxigenasas. La lipoxigenasa cinco y doce (LOX-5 y LOX-12) presentes en el metabolismo del araquidonato, se encuentran sobre-expresadas en células de cáncer pancreático. La inactivación de estas dos enzimas inhibe la proliferación de células de cáncer pancreático (Ding XZ y col 1999a). Ding y col (1999b) demostraron en estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer pancreático humano PANC-1, Mia-Paca2, Capan2 y HPAF, que la inactivación de la LOX-5 y LOX12 por la chalcona baicaleina induce muerte celular programada de tipo apoptótica sugiriendo que la inactivación de las LOX afectan la proliferación de células de cáncer pancreático.

Las cinasas de residuos de tirosina son proteínas involucradas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Ullrich y Schlessinger 1990). La sobre-expresión de algunos receptores de factores de crecimiento con actividad de cinasas de residuos de tirosina ha sido encontrada en cánceres humanos tales como el de mama e hígado (Yang 1997). De esta forma es que los inhibidores de las cinasas de residuos de tirosina son considerados como una clase potencial de agentes antitumorales. Las chalconas también han demostrado tener actividad inhibitoria en las cinasas de residuos de tirosina *in vitro*, por ejemplo la buteina ( $\text{IC}_{50}$  8  $\mu\text{M}$ ), la marcina ( $\text{IC}_{50}$  19  $\mu\text{M}$ ) y la floretina ( $\text{IC}_{50}$  25  $\mu\text{M}$ ), ya que pueden anclarse al sitio de unión a ATP del receptor del factor de crecimiento epidermal (Yang 2001).

### **3.6. Derivados de heterodiariliden-ciclohexanona.**

En 1992, se evaluó la actividad citotóxica de chalconas de tipo diarilidenciclohexanonas, las (E)-3,5-bis(benziliden)-4-piperidonas (Figura 2) las cuales

mostraron actividad preferentemente en líneas celulares de leucemia mostrando valores de  $IC_{50}$  menores de  $10 \mu M$ , estos compuestos son una combinación de chalconas de tipo cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas y una  $\beta$ -aminocetona en la misma estructura (Dimmock y col 1992), las cuales además habían demostrado no tener efectos mutagénicos ni carcinogénicos debido a que poseen actividad sobre grupos tioles y no sobre aminas o hidroxilos de los ácidos nucleicos (Dimmock y col 1983).

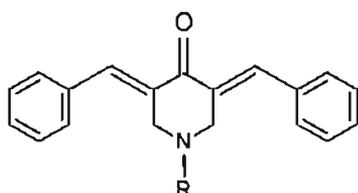


Figura 2. Compuesto derivado de chalcona (E)-3,5-bis(benziliden)-4-piperidona.

El-Barbary y col (1994) modificó algunas chalconas a las que se les sustituyeron los grupos benziliden por otros heteroarilos. Esta modificación fue utilizada por El-Subbagh y col (2000) para sintetizar nuevas series de (E)-3,5-bis(benziliden)-4-piperidonas, modificando los grupos arilo o heteroarilo de los extremos de la molécula (figura 3). Uno de éstos compuestos (compuesto III, figura 3) el cual contiene un grupo tienil; presentó actividad citotóxica en un panel de líneas celulares del Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos, con valores de  $IC_{50}$  desde 10 hasta  $35 \mu M$  (El-Subbagh y col 2000).

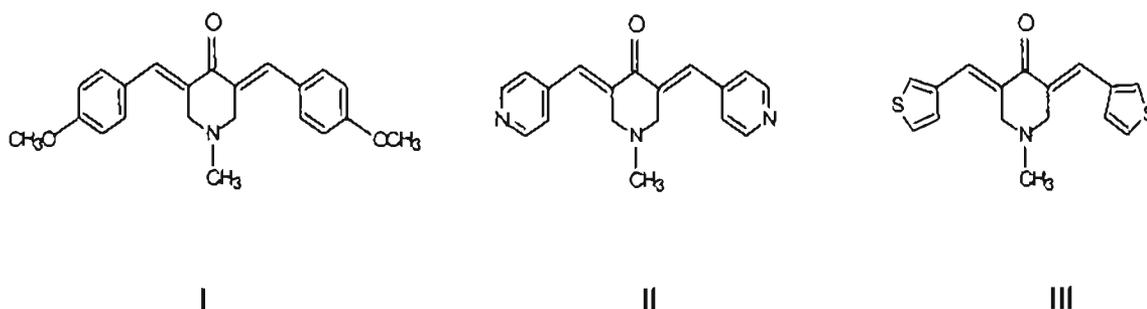


Figura 3. Compuestos derivados de chalconas I (E)-3,5-bis(4-metoxifenil)-4-piperidona, II (E)-3,5-bis(4-piridil)-4-piperidona, III (E)-3,5-bis(2-tienil)-4-piperidona.

En trabajos recientes se reportó la síntesis de nuevos derivados de chalconas con estructura similar a las (E)-3,5-bis(anil)-4-piperidona, en las cuales se sustituyó el grupo piperidona por piranonas (Martínez-Zuñiga 2001; Figura 4).

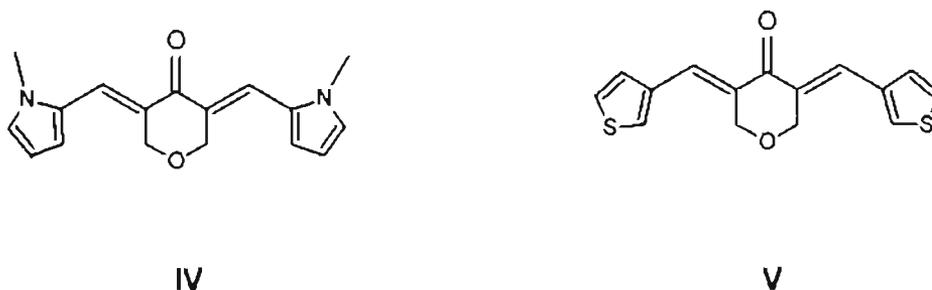


Figura 4. Nuevos derivados de chalconas diarilidenpiranona. **IV** 3,5-di(1'-metilpirrolil)identetrahidro-4H-piran-4-ona. **V** 3,5-ditenilidentetrahidro-4H-piran-4-ona.

Posteriormente, además de chalconas diariliden-piranona se sintetizaron nuevas diariliden-ciclohexanonas y a ambos tipos de chalconas con distintos sustituyentes se les adicionado el grupo pirimídico dimetil-uracilo (Martínez-Zúñiga 2001, Díaz y col 2003; Figura 5). La adición del dimetil-uracilo tiene el antecedente en el cual a compuestos como la ivalina le confería propiedades citotóxicas (Díaz y col 1998, Quintero y col 1999). Células HeLa tratadas *in vitro* con el derivado pirimídico de la ivalina mostraron fragmentación de ADN, lo cual es sugerente de apoptosis (Martínez-Urbina 2001).

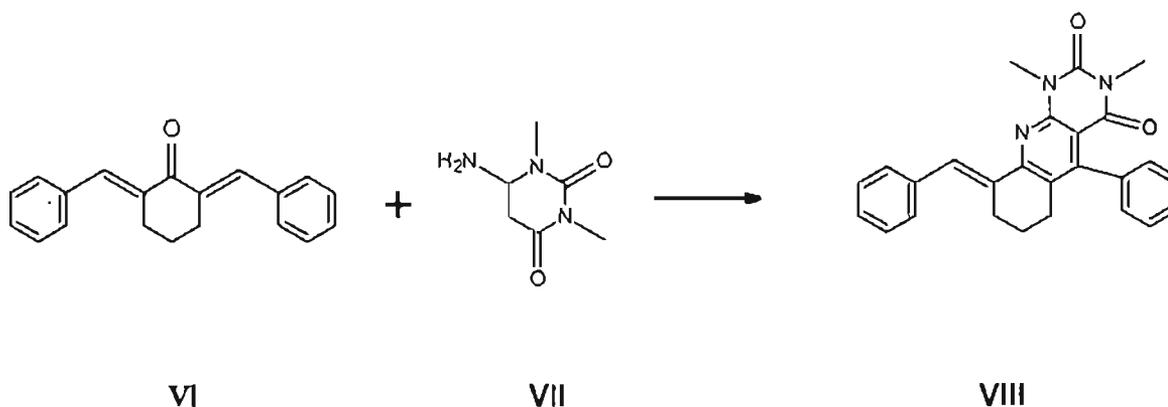
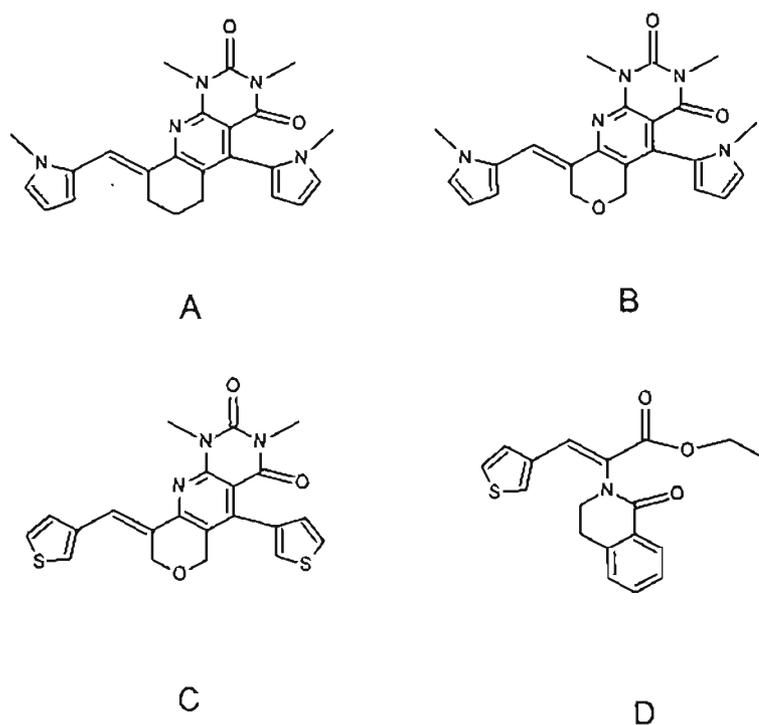


Figura 5. Reacción general de adición de un grupo pirimídico a una molécula de diarilidenciclohexanona. **VI** 2,6-dibencilidenciclohexanona **VII** 6-amino-1,3-dimetiluracilo, **VIII** 6,7,8 Trihidro-9-benziliden-1,3-dimetil-5-fenil (1H,3H) pirimido[4,5-b]quinolin-2,4-diona (Díaz y col 2003).

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio, se determinó la viabilidad celular por ensayos de reducción de MTT. En el cual se trataron células HeLa con el derivado pirimídico de una diariliden-ciclohexanona (compuesto VIII; Figura 5). Este último no tuvo actividad inhibitoria en la proliferación celular a concentraciones de hasta 40  $\mu$ M. (resultados no publicados). Sin embargo, otros derivados en donde los grupos arilos de las chalconas fueron sustituidos por heteroarilos como el metil-pirrol o el tienil, si presentaron actividad inhibitoria de la proliferación en células HeLa.

Del grupo de nuevos derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas, se seleccionaron los compuestos A, B, C, y D (Figura 6). Estos compuestos serán evaluados en líneas celulares humanas con el objeto de conocer su actividad citotóxica. El compuesto D corresponde a una chalcona, la cual no contiene el dimetil-uracilo (Figura 6).



**Figura 6. Nuevos compuestos derivados de diarilidenciclohexanonas:**

- A.** (9E)-1,3-dimetil-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-9-[(1-metil-1H-pirrol-2-il)metilen]-6,7,8,9 tetrahidropirimido[4,5-b]quinolin2,4(1H.3H)-diona  
**B.** (9E)-1,3-dimetil-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-9-[(1-metil-1H-pirrol-2-il)metilen]-6,7,8,9 tetrahidro-2H-pirano[pirido[2,3-d]pirimidina-2,4(3H)-diona  
**C.** (9Z)-1,3-dimetil-5-tien-2-il-9-(tien-2-ilmetilen)-1,6,8,9-tetrahidro-2H-pirano[3',4':5,6]pirido [2,3-d]pirimidina-2,4(3H)-diona  
**D.** Etil(2Z)-3-ciclopenta-1,4-dien-1-il-2-(1-oxo-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)acrilato.

#### **4. Hipótesis.**

Basados en los datos reportados en la literatura acerca de la actividad citotóxica de las chalconas en líneas celulares, se espera que nuevos derivados de chalconas como los heterodiariliden-ciclohexanonas modificados con la adición de un grupo pirimídico, puedan presentar propiedades citotóxicas en líneas celulares *in vitro*.

#### **5. Objetivo general.**

Evaluar la actividad citotóxica de los nuevos derivados heterodiariliden-ciclohexanonas A, B, C, D en líneas celulares y caracterizar su mecanismo de acción citotóxica.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Evaluar la inhibición de la proliferación celular de los nuevos derivados de heterodiariliden-ciclohexanona A, B, C y D en las líneas celulares HeLa, Calo, C33, SW480, SW620, MCF-7, y K-562 y determinar el valor de IC<sub>50</sub>. Seleccionar el compuesto más activo para utilizarse en los subsecuentes experimentos.
2. Determinar la distribución de las fases del ciclo celular, en líneas celulares tratadas con el compuesto más activo.
3. Determinar si la inhibición de la proliferación es por citostasis ó por muerte celular ya sea por apoptosis ó necrosis.
  - 3.1. Evaluar la posible fragmentación del ADN debida a apoptosis.
  - 3.2. Analizar la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas.
  - 3.3. Determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como marcador de daño celular de tipo necrótico.
  - 3.4 Observar el efecto del nuevo compuesto en la morfología celular.

## 7. Material y métodos.

**7.1. Líneas celulares.** Las líneas celulares utilizadas son; HeLa, Calo y C33 (cáncer de cerviz), SW480 y SW620 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (adenocarcinoma de mama); K-562 (leucemia mielogénica crónica). Las células HeLa, C-33 y MCF-7 fueron proporcionadas por el Dr. Alejandro García-Carrancá del Instituto Nacional de Cancerología de México, las células K-562 por el Dr. José Sullivan López del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México, las células SW620 y SW480 por el Dr. Manuel Perucho del Instituto Burnham de la Jolla, Estados Unidos de América y las células Calo fueron proporcionadas por el Dr. Benny Weiss Steider de la FES Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**7.2. Heterodiariliden-ciclohexanonas.** Los nuevos derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas (A, B, C y D), fueron sintetizados basándose en la reacción de adición de Michael por Díaz y col (2003), del Instituto de química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Figura 6).

**7.3. Cultivo de líneas celulares.** Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio D-MEM (Dulbecco Medium Eagle Modified) suplementado con 100 mM de piruvato de sodio, 10 mM de aminoácidos no esenciales, 10,000 U/ml de penicilina G sódica, 10,000 U/ml de sulfato de estreptomina, 25 µg/ml de anfotericina B y 10% de suero fetal bovino (reactivos Invitrogen). Las líneas celulares se cultivaron en una incubadora (Forma Scientific) a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

**7.4. Determinación de viabilidad celular e IC<sub>50</sub> por MTT.** La inhibición de la proliferación de los compuestos A, B, C y D, se analizó en las líneas celulares (HeLa, Calo, C33, SW480, SW620, MCF-7 y K-562), utilizando la determinación de viabilidad celular por reducción de la sal de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio). Se incubaron en una placa de cultivo de 96 pozos, en cada pozo se colocaron de 5 a 6 X 10<sup>3</sup> células en 250 µl de medio de cultivo D-MEM y se cultivaron durante 24 h. Posteriormente, las células se cultivaron durante 48 h en presencia de los compuestos disueltos en DMSO (dimetil sulfóxido) a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40 µM. Las determinaciones se efectuaron por octuplicado para cada una de las concentraciones.

Como controles se incubaron células sin tratar y tratadas con 0.6  $\mu$ L DMSO el cual fue el volumen utilizado para agregar los compuestos, al término de la incubación se agregaron a cada uno de los pozos, 20  $\mu$ L de una solución de MTT de 5 mg/ml (Sigma, cat M2128), incubando durante 4 h a 37 °C, posteriormente el medio de cultivo fue descartado y el producto de la reacción (sales de formazan precipitadas) fue disuelto mediante 250  $\mu$ L de DMSO. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 540 nm en un lector de microplacas (Dynex Technologies; Mossman 1983 y Carmichael y col 1987). El porcentaje de inhibición de la proliferación se calculó según la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(A) (100) / B]$$

En la que A es el promedio de la densidad óptica obtenida por las células tratadas con los compuestos y B es el promedio de células control sin tratamiento. Con los resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación celular en función de la concentración, se calcularon los valores de IC<sub>50</sub> (concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular) de los compuestos con actividad inhibitoria. Las IC<sub>50</sub> se obtuvieron por regresión no lineal utilizando el programa Origin 6.

**7.5. Determinación de viabilidad por cristal violeta.** Las células HeLa, SW480, MCF-7 y K-562, fueron cultivadas en placas de 96 pozos, con un número inicial de  $5 \times 10^3$  en 250  $\mu$ L de D-MEM e incubación durante 24 h. Posteriormente se adicionaron los compuestos A y B a la concentración de IC<sub>50</sub> obtenida por MTT, al final de cada uno de los tiempos 0, 6, 24, 30 y 48 h de tratamiento, el medio de cultivo se retiró y las células fueron fijadas con 100  $\mu$ L de una solución de formaldehído al 4% en PBS frío (durante 15 min a 4 °C). Las células fijadas fueron lavadas en tres veces con agua desionizada. Posteriormente, las células se secaron y se tiñeron durante 20 min, con 100  $\mu$ L de una solución al 0.1% de cristal violeta disuelto en un solución 200 mM de ácido fosfórico a pH 6. Se descartó cuidadosamente la solución de cristal violeta por aspiración y se lavó tres veces con agua desionizada para eliminar el exceso del cristal violeta. Los pozos de cultivo nuevamente se secaron y el cristal violeta de las células teñidas fue disuelto con 100  $\mu$ L de una solución de ácido acético al 10% durante 30 min. La densidad óptica es directamente proporcional al número de células y fue determinada en un lector de microplacas a 590

nm, el % de inhibición se obtiene de la misma manera que en el caso de MTT (López y col 2002).

**7.6. Determinación de viabilidad por exclusión de azul tripano.** Las células HeLa y SW480 se cultivaron cada una en placas de cultivo de 96 pozos en un número de entre 5 a  $6 \times 10^3$  células con 250  $\mu$ l de D-MEM por pozo, al término de 24 h de incubación las células se trataron con el compuesto A a 10 y 5  $\mu$ M para HeLa y SW480 respectivamente se determinó el conteo celular por tinción con azul tripano a 0, 24 y 48 h de la siguiente manera: El medio de cultivo de cada pozo fue recolectado cuidadosamente por aspiración, posteriormente, al pozo se le agregaron 25  $\mu$ l de una solución al 0.05% de tripsina en cloruro de sodio al 0.85%, la digestión fue detenida después de 3 min con 25  $\mu$ l de medio D-MEM con el 10% de suero fetal bovino. Las células desprendidas fueron cuidadosamente resuspendidas y 25  $\mu$ l de esta suspensión se mezcló 1:1 con una solución de 10  $\mu$ g/ml de azul tripano en cloruro de sodio al 0.85%, la viabilidad de las células fue determinada en un hemocitómetro utilizando un microscopio invertido (Olympus IM; López y col 2002).

**7.7. Análisis del ciclo celular por citofluorometría de flujo.** Las células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A a una concentración de 10 y 5  $\mu$ M, respectivamente, fueron incubadas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en cajas de petri de 10 cm de diámetro durante 24 h, como control normal se usaron ambas líneas sin tratamiento y como control positivo se uso taxol a 50 nM. Los cultivos celulares se incubaron durante 12, 24, 48 y 72 h. Al término de cada tiempo se recolectó el medio de cultivo en un tubo estéril de poliestireno de 15 ml, las células se lavaron con 2 ml PBS recolectándolas en el mismo tubo, posteriormente, a las células se les agregaron 2 ml de PBS-EDTA y se incubó durante 10 min, las células se cosecharon resuspendiéndolas cuidadosamente con una pipeta Pasteur y se colocaron en el mismo tubo de recolección. La suspensión celular recolectada después de cada tiempo de incubación se centrifugó a  $78 \times g$  durante 5 min y el sobrenadante se descartó por aspiración, al botón celular se le agregó 1 ml de PBS frío y se resuspendió suavemente, posteriormente, se le agregaron por goteo 9 ml de etanol frío al 70%, resuspendiendo con cuidado. Las células fijadas se conservaron a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después de la fijación, la suspensión celular se centrifugó a  $78 \times g$  durante 5 min la solución etanólica se retiró y el botón celular se lavó y resuspendió en PBS frío, se

centrifugó nuevamente y el PBS se retiró. El botón celular se resuspendió suavemente en 500  $\mu$ l de una solución 0.02 mg/ml de Ioduro de propidio (Sigma), 0.2 mg/ml de RNAsa libre de DNAsa (Invitrogene), 0.1% de Tritón X100 (Sigma) en PBS pH 7.4, la suspensión se mantiene en hielo hasta su análisis (Gong y Col 1994). Las células se procesaron en un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson.). Los datos de 20,000 eventos adquiridos fueron analizados con el programa ModFitLT el resultado se expresó en porcentaje de la población celular en cada una de las fases del ciclo celular

**7.8. Determinación de la fragmentación de ADN por TUNEL.** Las células SW480, se incubaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en cajas petri de 10 cm. de diámetro, dentro de la cual se colocaron previamente en su superficie cubreobjetos redondos estériles, en los cuales se desarrollaron los cultivos durante 24 h. Posteriormente, las células SW480 se trataron con el compuesto A a la concentración de 5  $\mu$ M A 48 Y 72 h. Los controles utilizados fueron: un control negativo en el cual se emplearon células sin tratamiento; un control positivo de la técnica en el cual se utilizó DNAsa, un control positivo de células tratadas con taxol a 50 nm. Al término del tratamiento con los compuestos, el medio de cultivo se retiró y las células se lavaron cuidadosamente con PBS frío, el cual fue retirado. Posteriormente, se fijaron durante una hora con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS a temperatura ambiente. Se retiró el paraformaldehído y se lavaron las células con PBS frío, la caja de cultivo se selló con parafilm® y se conservó en refrigeración de 4 a 8 °C Hasta su procesamiento. Para la detección de la fragmentación del ADN se utilizó un estuche comercial (Roche cat 1684795). Las células fijadas se lavaron con PBS a temperatura ambiente, se permeabilizaron con una solución de Tritón X100 al 0.1% (Sigma) en citrato de sodio al 0.1% (JT Baker) durante 2 min en hielo. Los cubre objetos con las células fijadas se lavaron con PBS. En el caso de las células del control negativo se trataron con la solución amortiguadora de reacción, para el control positivo de la técnica, las células fueron tratadas con 1 mg/ml de Dnasa I (Invitrogene) durante 10 min a temperatura ambiente y se lavó con PBS.

Las células tratadas con el compuesto A, así como las tratadas con taxol y las digeridas con DNAsa I fueron tratadas con la mezcla de reacción de TUNEL. Posteriormente, se incubaron durante una hora a 37 °C en cámara húmeda. Una vez incubadas las células se lavaron en dos ocasiones con PBS y se montaron sobre un porta objetos con medio de montaje para microscopía de fluorescencia (Dako). Las muestras se

observaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse C600; técnica de Gorczyca y col 1993, modificada).

**7.9. Detección de la expresión de proteínas por inmunoelectro-transferencia (western blot).** Las células HeLa se cultivaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en cajas de 10 cm de diámetro durante 24 h, el cultivo celular se expuso a concentraciones de 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  del compuesto A a 24 h. Como control positivo se emplearon células tratadas con 50 nM de taxol y como control negativo células sin tratamiento. Al término del tratamiento con el compuesto A, se procedió a la cosecha de células comenzando con la recolección del medio de cultivo en un tubo estéril de poliestireno de 15 ml en hielo, a la placa de cultivo se le adicionó 2 ml de PBS frío, la monocapa de células se desprendió con un gendarme y se recolectó en el mismo tubo. La suspensión celular se centrifugó a  $176 \times g$  durante 5 min y el sobrenadante se decantó cuidadosamente. Se resuspendió el botón celular con 1 ml de PBS pH 7.4 frío y se traspasó a un tubo de eppendorf® de 1.5 ml, posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm por 5 min (en una centrifuga eppendorf® mod 1475) y se descartó el sobrenadante, al botón celular se le agregaron 150  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de lisis tras lo cual se resuspendió con jeringa de insulina estéril, se dejó reposar 30 min a 4 °C y posteriormente, se centrifugó a  $10483 \times g$  durante 30 min a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Beckman mod. GS15R rotor mod. F2402H). El sobrenadante se recolectó y se le cuantificó el contenido de proteínas mediante la técnica de Bradford. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), en la cual se colocaron 100  $\mu\text{g}$  de proteínas por carril. Las proteínas separadas en la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond™ ECL™) por electrotransferencia semiseca (Trans-Blot® SD) a 20 volts durante 1 h. La superficie de la membrana fue bloqueada con una solución de 5% de leche descremada en polvo y 0.5 % de albúmina en TBS, durante 2 h a temperatura ambiente. La membrana se incubó con una solución de TBS que contiene el primer anticuerpo contra la proteína de interés (P53, Bax, Bcl-2, o Caspasa-3) durante 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, las membranas se lavaron con Tween 20 al 0.1% en TBS durante 15 min, se incubaron con una solución de TBS conteniendo el 2º anticuerpo conjugado a peroxidasa (IgG-HRP) dirigido hacia el anticuerpo primario. Posteriormente la membranas se lavaron con tween al 0.1% en TBS por 5 min tres veces

y las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el substrato comercial ECL™ (Amersham Biosciences; Técnica de Towbin 1979, modificada).

**7.10. Análisis morfológico por tinción con hematoxilina.** Las células HeLa se incubaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en cajas de 10 cm de diámetro en la que se habían colocado previamente los cubreobjetos redondos estériles, desarrollando el cultivo celular sobre estos cubreobjetos durante 24 h. Las células se trataron con el compuesto A a  $10 \mu\text{M}$  durante 12, 24 y 48 h, como control normal se emplearon células sin tratamiento, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% como lo indica la técnica del TUNEL. Las células se lavaron dos veces con PBS durante 5 min y un vez con agua destilada. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina durante 2.5 min y se lavaron con agua destilada, seguido por un lavado con una solución saturada de carbonato de litio y posteriormente se incubaron con agua destilada por 5 min. Las células se deshidrataron con lavados con etanol al 50, 70, y 96 % cada uno durante 2 min, los cubre objetos se sumergieron en una mezcla 1:1 de etanol-xilol durante 1 min y dos veces en xilol 1 min cada vez, previo a su montaje sobre un porta objetos utilizando resina clarión® las preparaciones se observaron en un microscopio óptico. (Nikon Eclipse C600).

**7.11. Determinación de la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa.** Se determinó la actividad enzimática de la LDH liberada en el medio de cultivo antes y después de lisar las células HeLa, SW480 y MCF-7 con y sin tratamiento con el compuesto A. Las células se crecieron a una densidad de  $4 \times 10^4$  en placas de cultivo de 24 pozos en  $500 \mu\text{L}$  de medio de cultivo DMEM al 10% de SFB durante 24 h, se trataron con el compuesto A a la concentración de la  $\text{IC}_{50}$ , durante 48 h al final de la incubación se recolectaron  $50 \mu\text{L}$  del medio de cultivo y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso, en esta muestra de medio se determinará la actividad de LDH antes de lisar a las células. Posteriormente, las células se lisan con la  $9.3 \mu\text{L}$  de DMEM con 10 % de Triton X-100 durante 5 min tomando  $50 \mu\text{L}$  del extracto celular colectando y guardando también a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se llevó a cabo la determinación colocando  $833 \mu\text{L}$  de una solución de NADH  $0.24 \text{ mM}$  disuelto en Tris  $62.43 \text{ mM}$  y NaCl  $203.6 \text{ mM}$  y  $16.7 \mu\text{L}$  de la muestra, colocaron en una celda de 1 ml, se mezcló y se leyó la densidad óptica a  $340 \text{ nm}$  cada 15 seg durante 2 min, en un espectrofotómetro Beckman DU-600. Posteriormente, se adicionaron a la misma celda  $150.3 \mu\text{L}$  de una solución de piruvato de sodio  $0.97 \text{ mM}$

disuelto en Tris 62.43 mM y NaCl 203.6 mM y se leyó nuevamente la densidad óptica a 340 nm cada 15 seg, durante 2 min. La actividad de LDH liberada de células tratadas con el compuesto A se expresó como el porcentaje de la actividad enzimática en el medio de cultivo respecto al 100% de la actividad enzimática que representa la actividad de LDH obtenida del correspondiente extracto celular obtenido por lisis (López y col 2002).

**7.12. Análisis de la inhibición de proteínas de novo en la vacuolización.** Las células HeLa se incubaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células en cajas de 10 cm de diámetro a la que previamente se le había colocado en toda su superficie cubreobjetos redondos estériles, desarrollando el cultivo celular sobre estos cubreobjetos durante 24 h. Posteriormente, las células se trataron con cicloheximida a 50  $\mu\text{g/ml}$  durante 3 horas, después se adicionó el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  incubando durante 24 h, al término del tratamiento, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % como se indica en la técnica del TUNEL y se tiñeron con hematoxilina. También de forma similar se trataron las células HeLa con cicloheximida más el compuesto A y se evaluaron luego de 24 h de tratamiento.

**7.13. Tinción de vacuolas con rojo Neutro.** Se crecieron células HeLa a una densidad de  $1 \times 10^6$  en cubreobjetos dispuestos en placas de cultivo de 5 cm de diámetro se crecieron durante 24 h, se agregó el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h, al término del tratamiento el medio de cultivo se descartó y las células adheridas a los cubreobjetos se lavaron con PBS pH 7.4. Enseguida se tiñeron 5 min con una solución al 1.0 % de rojo neutro en solución salina isotónica, después de este tiempo se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y finalmente, se les agregó el medio de montaje (Dako) y se observaron en un microscopio óptico (Nikon Eclipse C600; Mitra y col 2000).

**7.14 Análisis estadístico.** Se utilizó la prueba de t de Student, para tres experimentos independientes de: ensayos de MTT, tinción por azul tripano, citofluorometría de flujo y actividad de LDH. Valores de  $p < .05$ (\*) y  $p < .005$ (\*\*) se consideraron significativos.

## 8. Resultados.

### 8.1. Los nuevos derivados heterodiariliden-ciclohexanonas inhiben la proliferación celular en líneas celulares.

Los valores de  $IC_{50}$  de los compuestos A y B se determinaron a partir de los resultados en la evaluación de la inhibición en la proliferación celular, utilizando la técnica de MTT, en las líneas celulares: C-33, HeLa, K-562, MCF-7, SW480, Calo y SW620. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8. Las diferencias significativas entre los compuestos con actividad inhibitoria se establecieron con la utilización de la prueba estadística t de Student (Figura 9).

#### Inhibición de la proliferación en líneas celulares por heterodiariliden-ciclohexanonas.

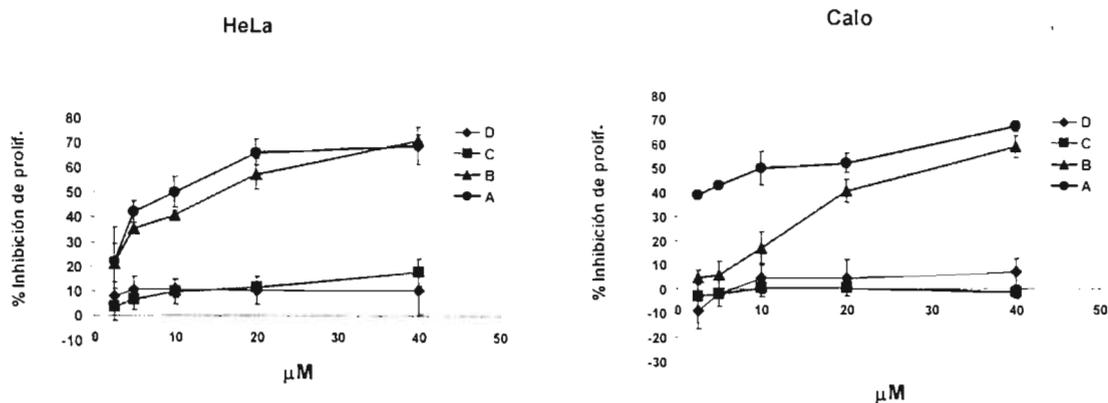


Figura 7. Inhibición de la proliferación en las líneas celulares HeLa y Calo, tratadas con los derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas A, B, C y D a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Los ensayos se efectuaron por octuplicado y son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

## Inhibición de la proliferación en líneas celulares por heterodiariliden-ciclohexanonas

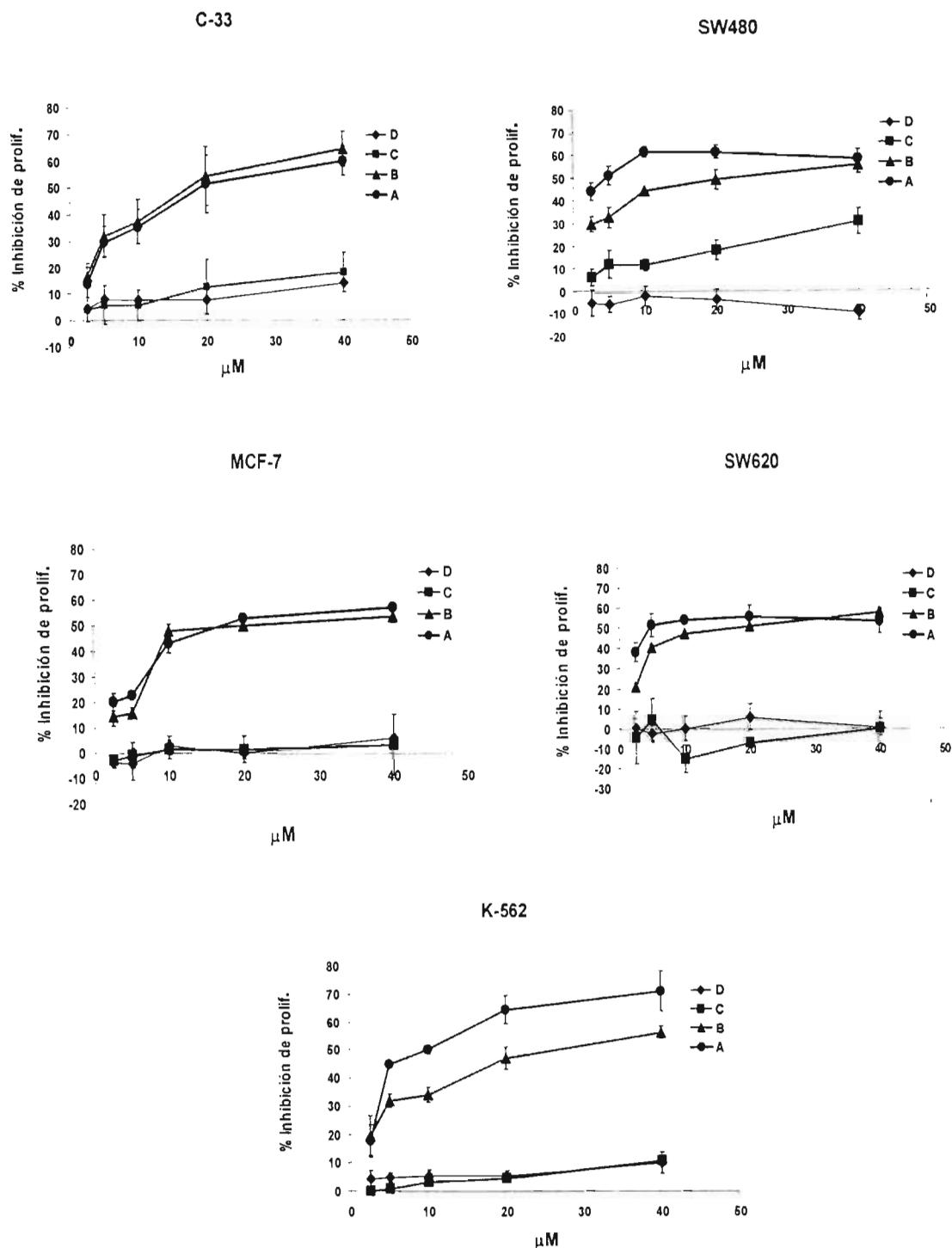


Figura 8. Inhibición de la proliferación en las líneas celulares C-33, SW480, MCF-7, SW620 y K562 tratadas con los derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas A, B, C y D a concentraciones de 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Los ensayos se efectuaron por triplicado y son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

Los resultados obtenidos muestran en la figura 7 y 8 que los compuestos A y B son los que presentaron mayor actividad inhibitoria, el compuesto C presentó menor actividad, por lo que no se calculo la IC<sub>50</sub>. El compuesto D fue inactivo. Con los resultados obtenidos se calcularon los valores de IC<sub>50</sub> de los compuestos A y B (Figura 9). Para el compuesto de A fueron de 22.2±10, 13.1±0.5, 10.4±0.8, 9.3±8.9, 4.4±1.77, 13.15±2.7 y 8.5±2.6 μM, en las líneas C-33, HeLa, K-562, MCF-7, SW480, Calo y SW620 respectivamente. Mientras que para el compuesto B en las mismas líneas fueron de 21.6±9.3, 19.6±11.4, 37.6±9.1, 8.4±4.6, 28.2±5.4, 43.7±5.1 y 13.95±2.6 μM, respectivamente. Estos datos muestran actividad similar de los compuestos A y B en las líneas C-33, HeLa, MCF-7 y SW620, mientras que en las líneas K-562, SW480 y Calo el compuesto A resultó más activo (Figura 9).

### Concentración a la cual los compuestos A y B inhiben el 50 % de la proliferación de las líneas celulares

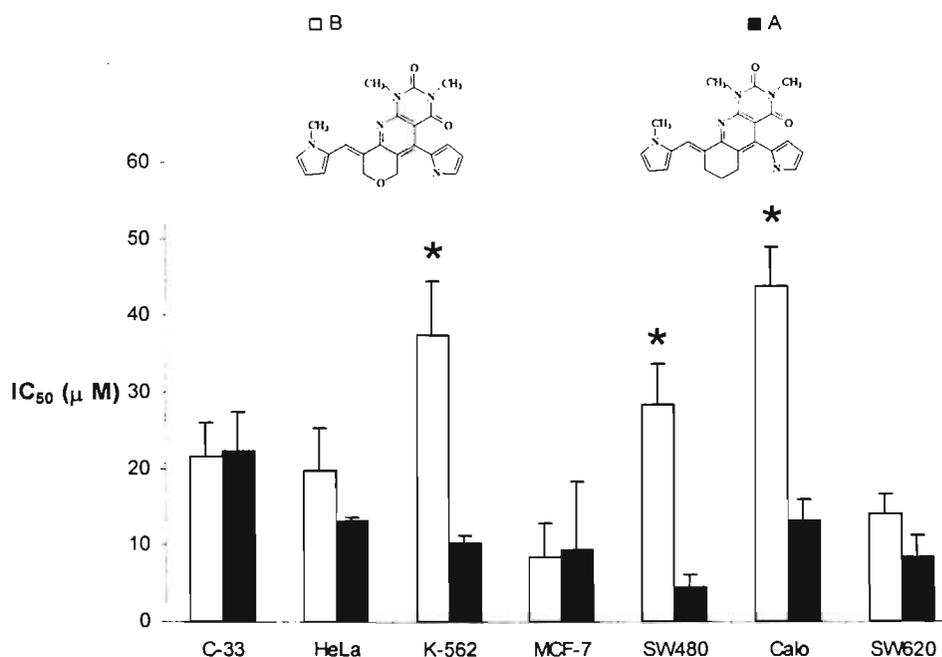


Figura 9. IC<sub>50</sub> de los compuestos A (barras negras) y B (barras blancas) en las líneas celulares utilizadas. La obtención de la IC<sub>50</sub> se obtuvo por regresión no lineal utilizando el programa Origin 6, a partir de los porcentajes de inhibición en función de la concentración (Figuras 8 y 9). Los resultados muestran los promedios de tres experimentos independientes ± DS (\*p<0.05).

## 8.2. La Inhibición de la proliferación celular por el compuesto A y B se incrementa en función del tiempo.

Con el propósito de demostrar a que tiempo se inicia la inhibición de la proliferación celular inducida por los compuestos A y B en las células HeLa, MCF-7 SW480 y K-562 utilizando la concentración de  $IC_{50}$ , se realizó un experimento de viabilidad por medio de la tinción con cristal violeta (que determina la viabilidad tiñendo a las células que permanecen adheridas después del tratamiento) en función del tiempo. Los resultados obtenidos demuestran que la inhibición en la proliferación de las líneas celulares tratadas con los compuestos A y B se inicia desde las primeras horas de tratamiento y alcanza un valor aproximado al 50% de inhibición a 48 h (Figura 10), este valor confirma los resultados obtenidos por medio del análisis con el MTT.

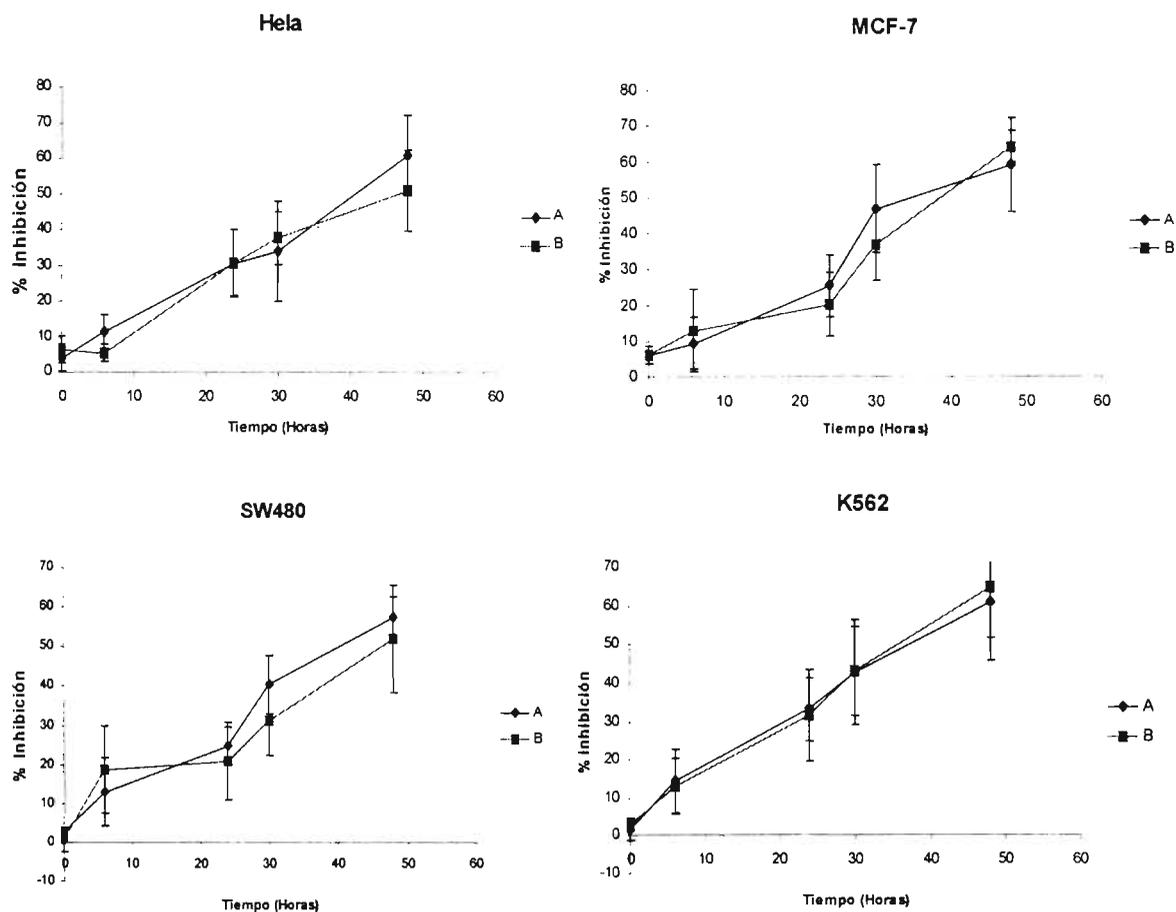


Figura 10. Porcentaje de inhibición de la proliferación obtenida por tinción con cristal violeta en las líneas celulares HeLa, MCF-7, SW480 y K-562 tratadas con los compuestos A y B a las concentraciones de  $IC_{50}$  obtenida por MTT a diferentes tiempos. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

### 8.3. La viabilidad celular de HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A, al inicio y al término del tratamiento no son significativamente diferentes.

Con el objeto de saber si la inhibición de la proliferación de las células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A a 10 y 5  $\mu\text{M}$ , es por citotoxicidad o por citostasis, se llevaron a cabo experimentos por exclusión con azul tripano (número de células vivas considerando la integridad de la membrana) y con MTT, los resultados obtenidos a 0 h fueron comparados con los de 24 y 48 h.

Las células HeLa tratadas con el compuesto A (Figura 11 A), como se puede observar muestran un ligero aumento no significativo en el número de células a 48 h con respecto al número inicial de células a tiempo cero, estos resultados comparados con los obtenidos con el MTT los cuales muestran un patrón similar, pueden ser explicados como una posible citostasis (Figura 11 B).

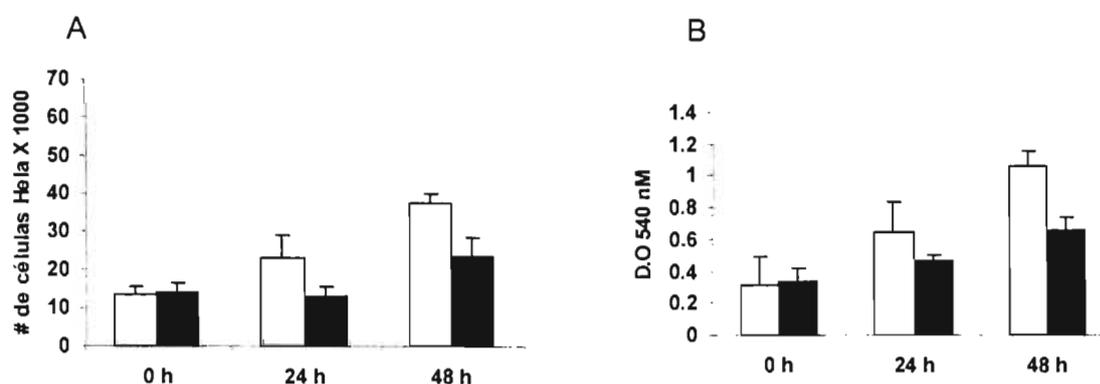


Figura 11. Gráfica A) Viabilidad por azul tripano en células HeLa tratadas con el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  (barras negras) y células control sin tratamiento (barras blancas) a 0, 24 y 48 h. Gráfica B) viabilidad por MTT en células HeLa tratadas con el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  (barras negras) y células control sin tratamiento (barras blancas) a 0, 24 y 48 h. Los resultados muestran los promedios de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

En el caso de SW480 (Figuras 12 A y 12 B), se puede observar que no hay diferencias significativas ni en el experimento con azul de tripano ni con el de MTT: a 0 y a 48 horas, estos resultados son similares a los obtenidos con células HeLa. Los resultados anteriores obtenidos en las células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A, en el experimento con azul tripano y con MTT, a 0 y 48 horas sugieren un posible efecto citostático.

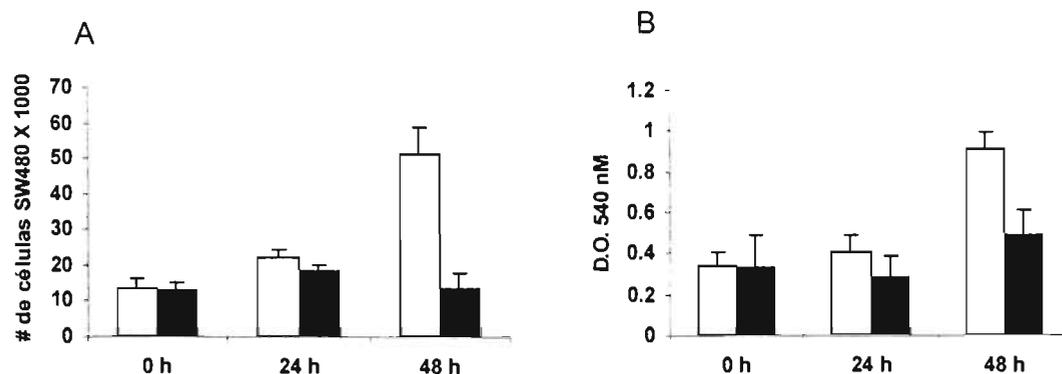


Figura 12. Gráfica A) Viabilidad por azul tripano en células SW480 tratadas con el compuesto A a 5  $\mu$ M (barras negras) y células control sin tratamiento (barras blancas) a 0, 24 y 48 h. Gráfica B) viabilidad por MTT en células SW480 tratadas con el compuesto A a 5  $\mu$ M (barras negras) y células control sin tratamiento (barras blancas) a 0, 24 y 48 h. Los resultados muestran los promedios de tres experimentos independientes  $\pm$  DS.

#### 8.4. La inhibición de la proliferación celular en células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A es por un proceso citotóxico.

Con el objeto de confirmar o descartar la citostasis se planteó el análisis de las alteraciones en las fases del ciclo celular por efecto del compuesto A, por citofluorometría de flujo. Las células HeLa fueron tratadas con el compuesto A 10  $\mu$ M a diferentes tiempos (12, 24, 48 y 72 h), en estos experimentos se utilizó como control positivo de taxol a 50 nM. Los resultados muestran que la fase G1 presenta un aumento a 24 y 72 h, lo que refleja una discreta detención de las células en G1 en cambio en la fase S se observa una ligera disminución a 24 y 72 h del tratamiento y en la fase G2/M no se observaron cambios en el número de células, estos resultados se pueden interpretar como un efecto citostático transitorio en la fase G1. La ausencia de una población subG1 sugerente de apoptosis, demuestran carencia de apoptosis en las células tratadas con el compuesto A. Contrario a lo que se observa en el control positivo de taxol, donde se presenta detención de las células en la fase G2/M así como la presencia de la fase subG1. Los resultados se muestran en las Figuras 13 y 15.

En el caso de SW480 tratadas con el compuesto A a 5  $\mu$ M, a diferentes tiempos, el análisis de los histogramas obtenidos demostró que no hubo diferencias en las diferentes fases del ciclo celular en comparación con el control de células sin tratamiento, mientras

que en el caso del control positivo con taxol el patrón fue similar al que presentó en el experimento con células HeLa (Figuras 14 y 15).

Los resultados en las células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A, obtenidos por citometría de flujo, no muestran alteración de las fases del ciclo celular. Por lo que la inhibición de la proliferación celular finalmente es por un proceso citotóxico y no citostático.

### El compuesto A no altera el ciclo celular de células HeLa.

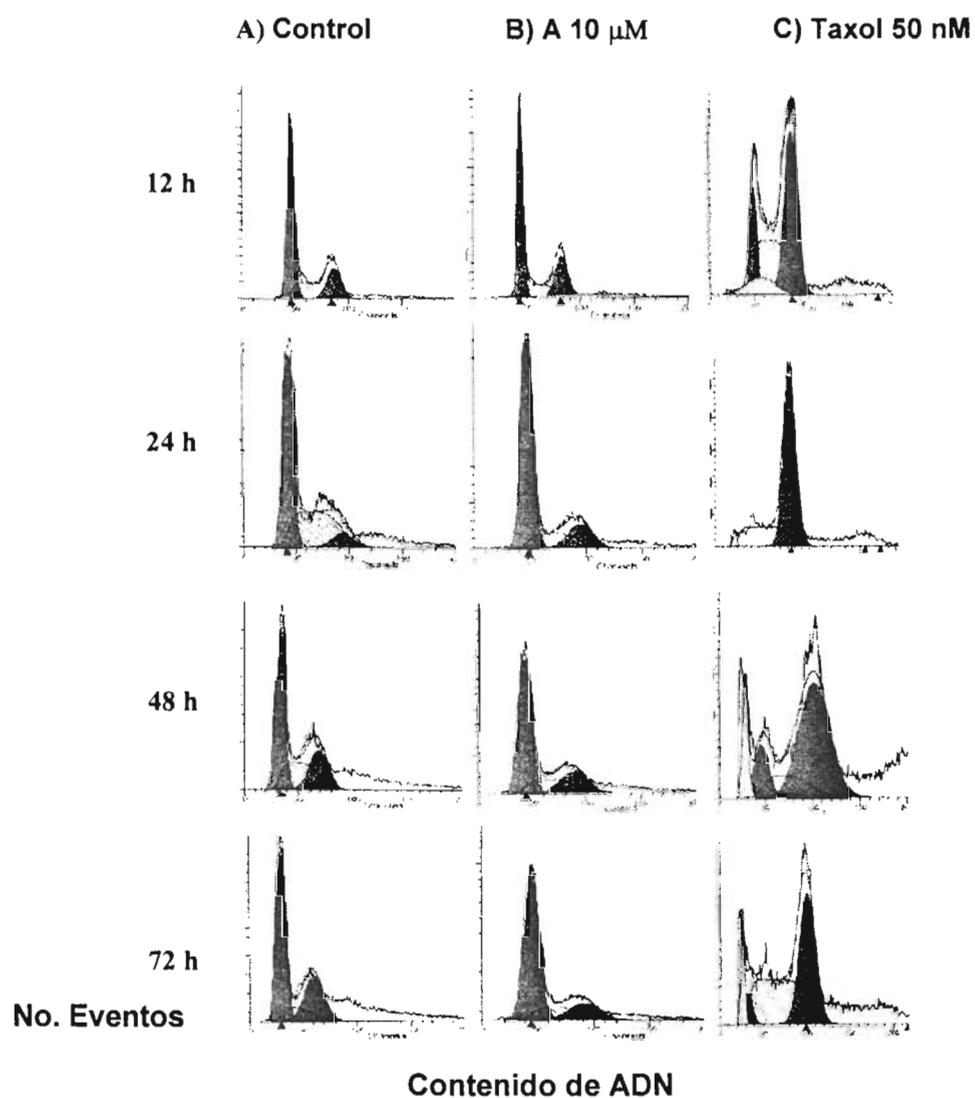


Figura 13.-Contenido de ADN A) Control de células HeLa sin tratar. B) Células HeLa tratadas con el compuesto A a 10μM. C) taxol a 50 nM. El contenido de ADN fue evaluado a 12, 24, 48 y 72 h. Los histogramas representan el resultado de uno de tres experimentos independientes.

**El compuesto A no altera el ciclo celular de células SW480.**

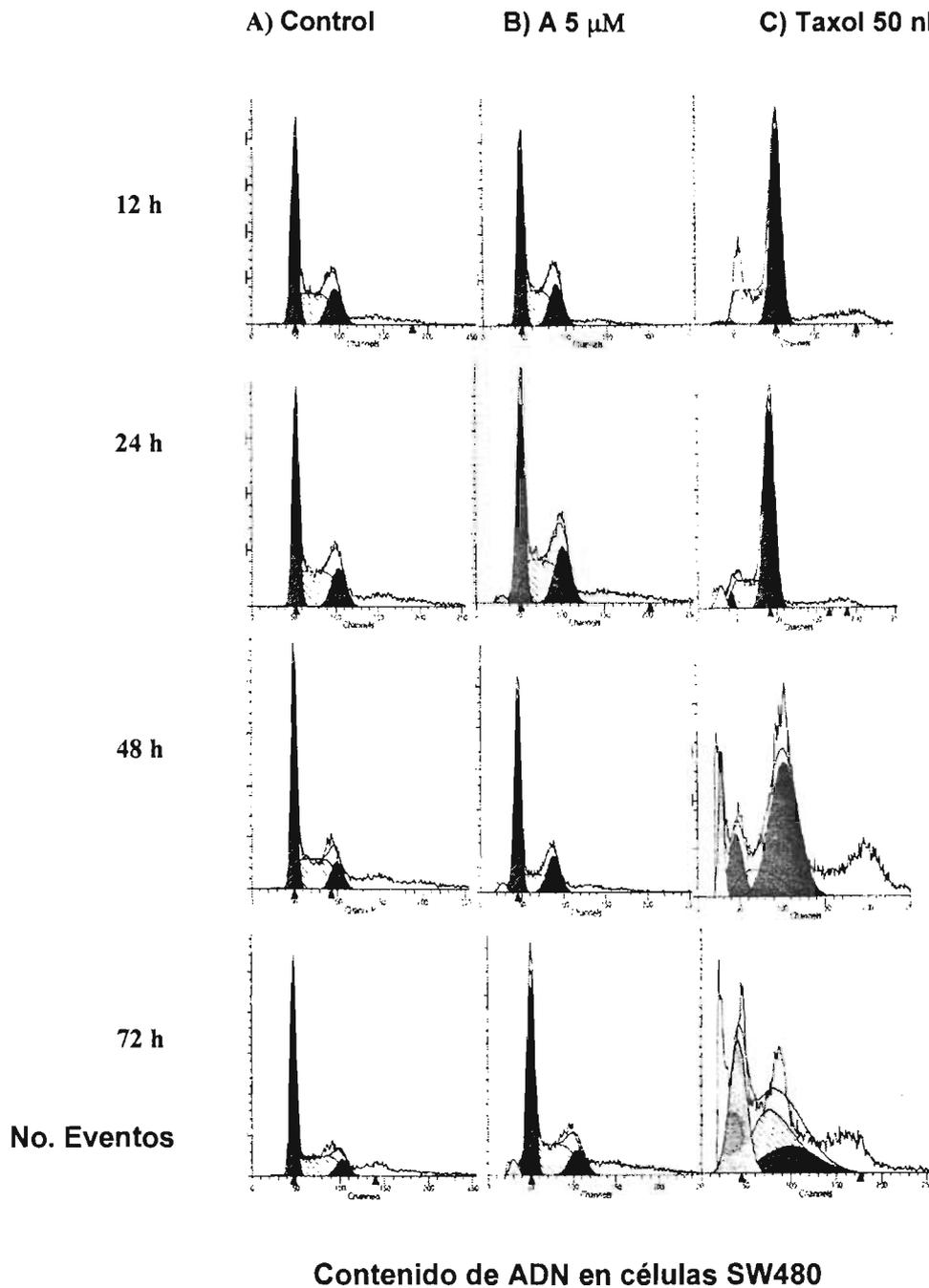


Figura 14.- Contenido del ADN A) Control de células SW480 sin tratar. B) Células SW480 tratadas con el compuesto A a 5  $\mu$ M. C) taxol a 50 nM. El contenido de ADN fue evaluado a 12, 24, 48 y 72 h. Los histogramas corresponden a uno de tres experimentos Independientes.

**Integración de las fases del ciclo celular obtenido por citofluorometría de flujo, de células HeLa y SW480 tratadas con el compuesto A.**

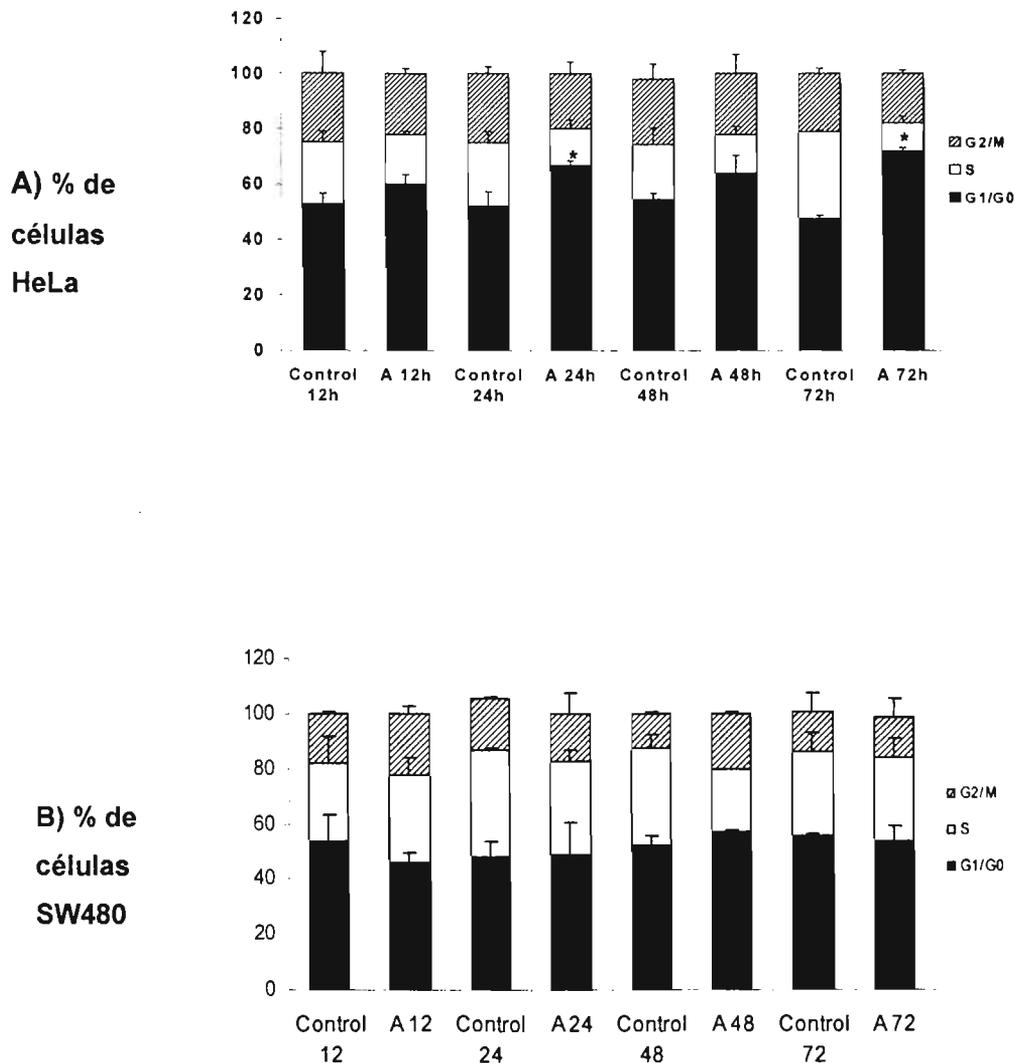


Figura 15. Distribución del % de las poblaciones en las fases del ciclo celular. A) Células HeLa, B) Células SW480, ambas células tratadas con el compuesto A a 10 y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente a 12, 24, 48 Y 72 h. Los resultados muestran los promedios de tres experimentos independientes  $\pm$  DS. (\*Significativamente diferente comparando entre el compuesto A y el control sin tratamiento para cada uno de los tiempos analizados y cada una de las fases ( $p < 0.05$ ; t de Student).

### 8.5. Las células SW480 tratadas con el compuesto A no presentan fragmentación de ADN.

Para determinar fragmentación del ADN sugerente de apoptosis, producida por el compuesto A en células SW480, se llevó a cabo el análisis por TUNEL (Figuras 16). Como se puede ver en estos resultados no se demostró ADN fragmentado, contrario a lo observado en el control positivo de taxol en células SW480, el cual si induce fragmentación del ADN, en forma de cromatina condensada y cuerpos apoptóticos, observada por microscopia de fluorescencia como se demuestra en la Figura 16. Los resultados de los experimentos llevados a cabo indican que el compuesto A no induce fragmentación del ADN en células SW480.

**El compuesto A no induce fragmentación de ADN en células SW480.**

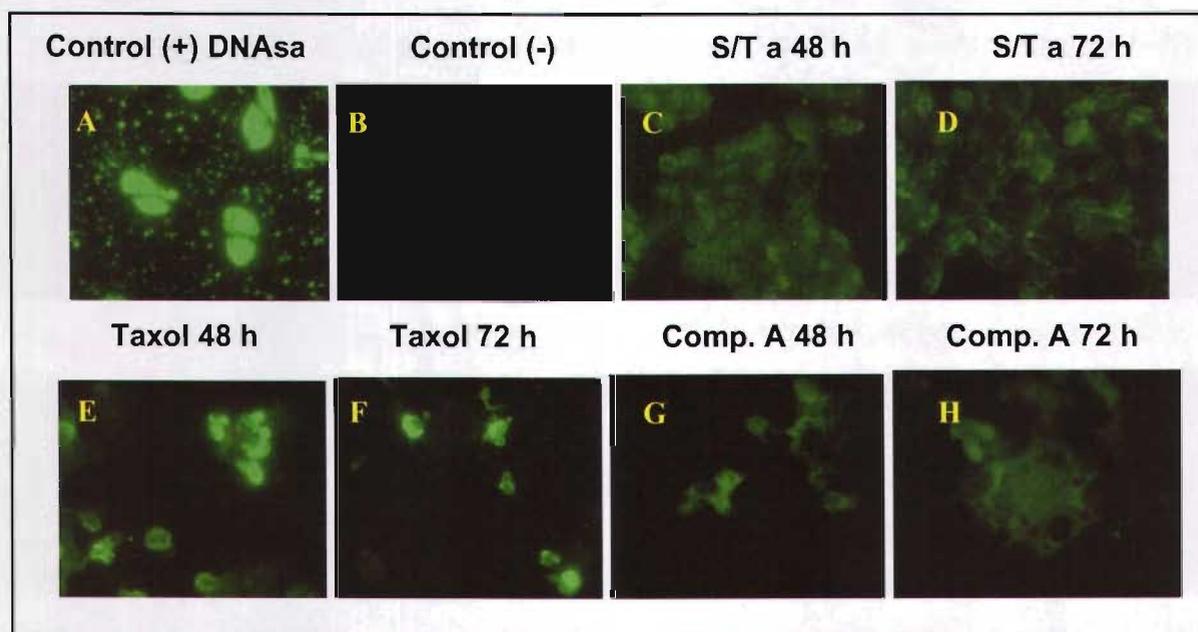


Figura 16. Análisis de TUNEL en células SW480. A) Control positivo de células tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de DNAsa, B) Control negativo, C) Control de células sin tratamiento a 48 h, D) Control de células sin tratamiento a 72 h, E) Células tratadas con taxol 50 nM a 48 h, F) Células tratadas con taxol 50 nM a 72 h, G) Células tratadas con el compuesto A a 5  $\mu\text{M}$  a 48 h, H) Células tratadas con el compuesto A a 5  $\mu\text{M}$  a 72 h.

## 8.6. El compuesto A no altero la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en células HeLa.

Con el objeto de confirmar la ausencia de apoptosis se llevó a cabo el análisis de la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas: p53, Bcl-2, Bax y caspasa 3. Las células HeLa fueron tratadas con el compuesto A a 2, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$  y como control positivo se uso el taxol a 50 nM a 24 h. Como se observa en las Figuras 17 y 18, ninguna de estas proteínas participa en el proceso de la inhibición de la proliferación de células HeLa tratadas con el compuesto A, lo cual demuestra que no se lleva a cabo por apoptosis. Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos con el taxol en donde en la expresión de Bcl-2 se observa una segunda banda superior que indica Bcl-2 fosforilada (Figura 17). En el caso de P53, caspasa 3 y Bax no se observa ningún cambio (Figuras 17 y 18).

### El compuesto A no alteró la expresión de P53 y Bcl-2 en células HeLa.

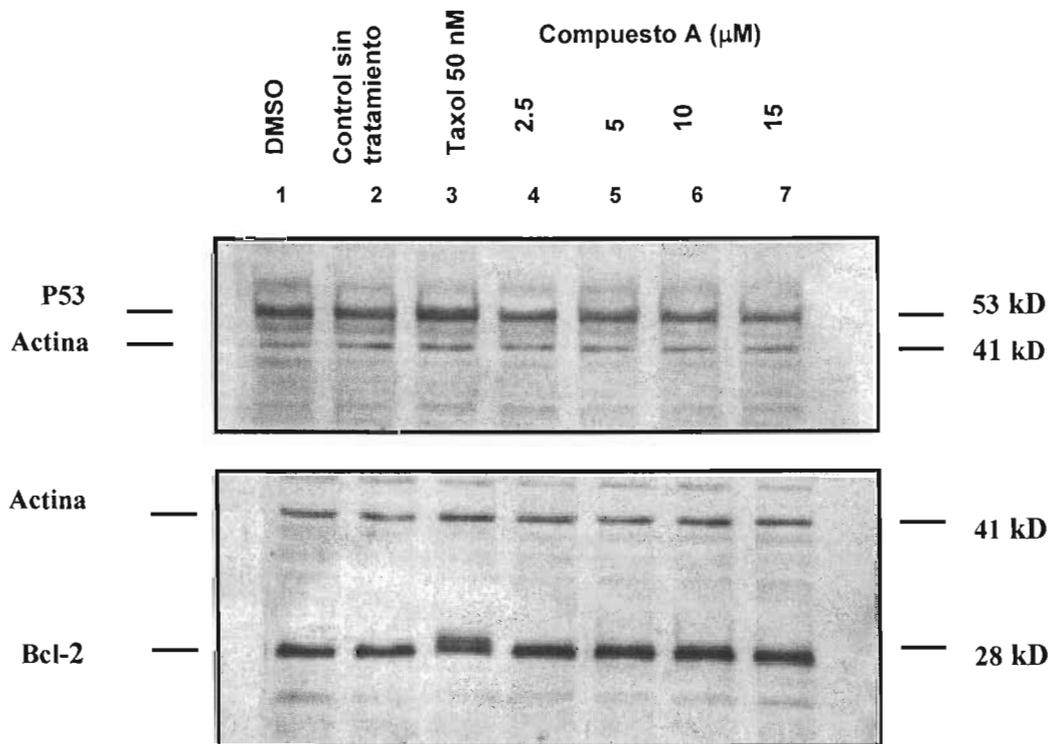


Figura 17. "Western blot" de las Proteínas P53, Bcl-2, y actina, en células HeLa, se utilizaron los anticuerpos DO-1, C-2, y sc-8432 (Santa cruz) respectivamente Carriles: 1) células control tratadas con DMSO; 2) control negativo sin tratamiento; 3) control positivo taxol 50 nM; 4-7) células tratadas con el compuesto A a 2, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

## El compuesto A no alteró la expresión de Bax y de Caspasa 3 en células HeLa.

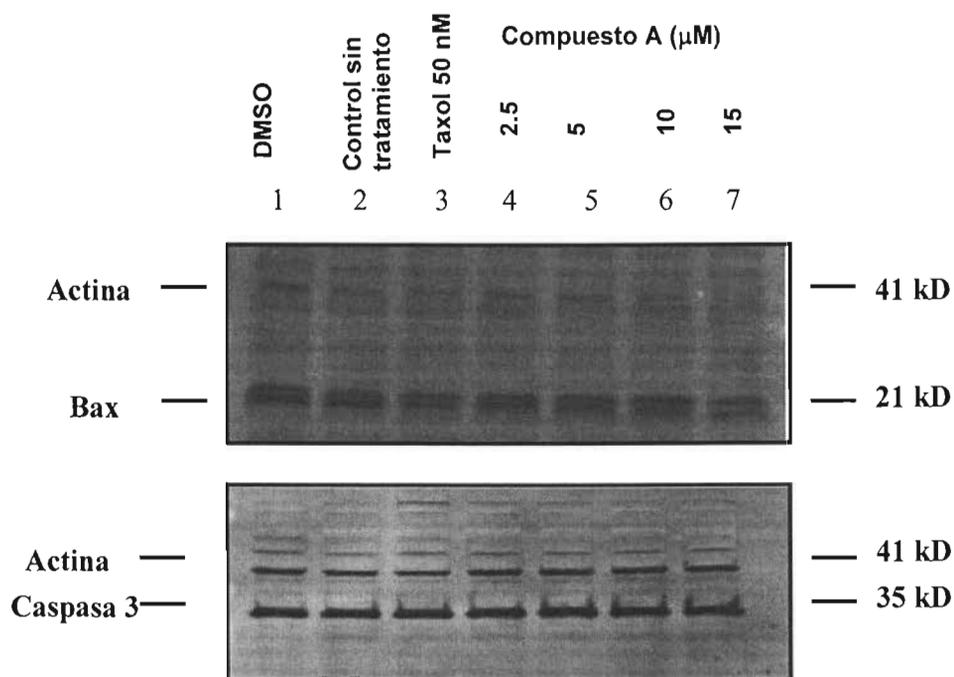


Figura 18. "Western blot" de las proteínas Bax y caspasa-3 y actina en células HeLa. Se utilizaron los anticuerpos B-9, E-8 y sc-8432 (Santa cruz) respectivamente. Carriles: 1) células control tratadas con DMSO; 2) control negativo sin tratamiento; 3) control positivo taxol 50 nM; 4-7) células tratadas con el compuesto A a 2, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### 8.7. El compuesto A induce la liberación del contenido citoplásmico en células HeLa SW480 y MCF-7.

Basándose en el conjunto de los resultados anteriores, se planteó investigar si el tipo de muerte celular es de tipo necrótica, por lo que se procedió a analizar la presencia de un marcador de este tipo de muerte celular, como es la liberación de la LDH del contenido citoplasmático. Se cuantificó la actividad de la enzima LDH en células HeLa, SW480 y MCF7 tratadas con el compuesto A, a 10, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente, a 48 y 72 h. El resultado se muestra en la Figura 19, en donde se observa que la liberación de LDH es significativamente mayor que el control de células sin tratar. Los resultados demuestran que el compuesto A induce la inhibición de la proliferación de las células tumorales mediante muerte celular de tipo necrótica.

**El compuesto A induce la liberación de LDH en líneas celulares.**

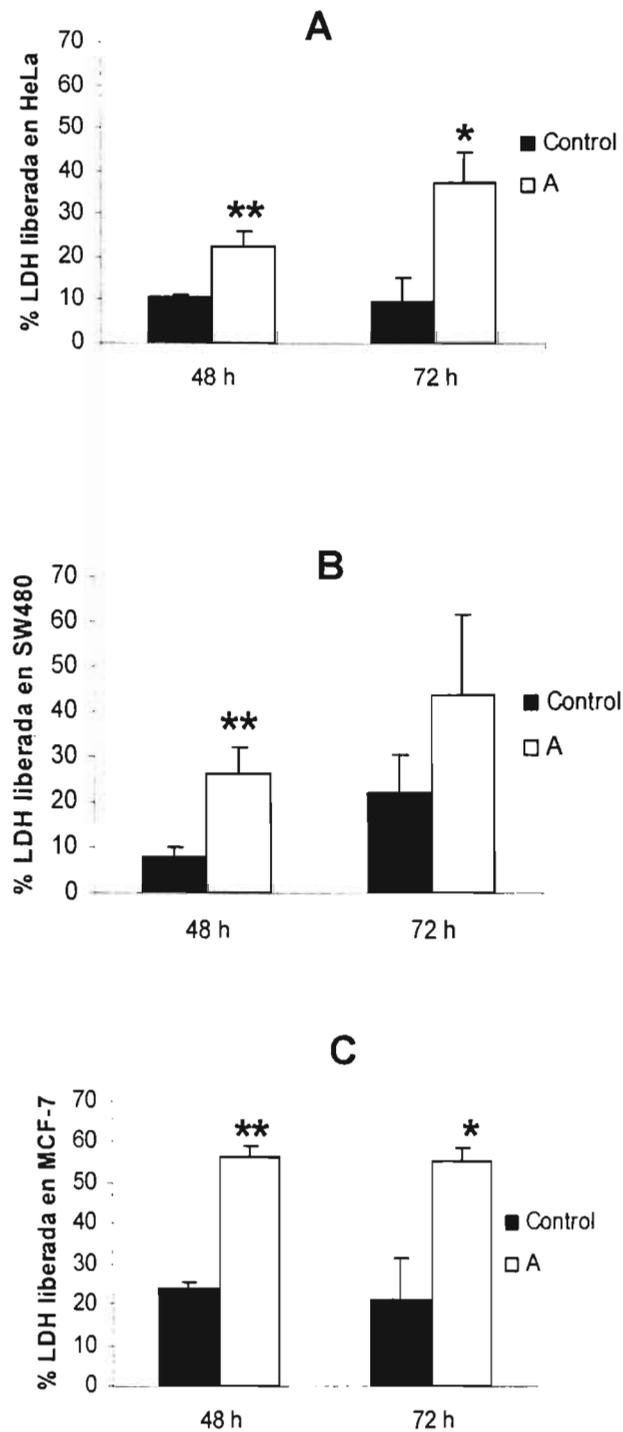
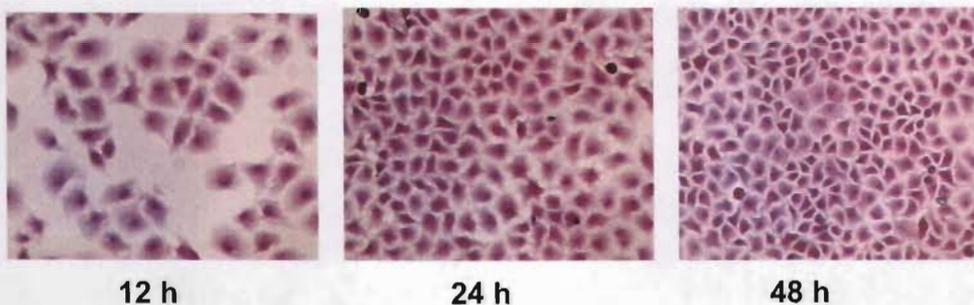


Figura 19. Liberación de LDH en células A) HeLa, B) SW480 y C) MCF7, tratadas con el compuesto A, a 10, 5 y 10  $\mu$ M respectivamente a 48 y 72 h. Los resultados son el promedio de 3 experimentos independientes  $\pm$  DS. (\* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.005; t de Student).

### 8.8. La citotoxicidad del compuesto A está asociada con formación de vacuolas.

Con la finalidad de analizar la morfología celular de células HeLa tratadas con el compuesto A a diferentes tiempos, se llevo a cabo una tinción con hematoxilina. El resultado muestra aumento del volumen celular y una marcada inducción de vacuolización en las células (Figura 20). Además la tinción con rojo neutro indicó que estas vacuolas son de tipo ácido (Figura 21), lo que sugiere que pueden ser de origen lisosomal provenientes de un proceso autofágico (Mitra R y col. 2000). Sin embargo, se ha reportado que la formación de de vacuolas de tipo autofágicas requieren de síntesis de proteínas de novo (Lawrence y col 1993, Marzella y col 1980 y Oliva y col 1992). Los experimentos realizados con el compuesto A en células HeLa en presencia de cicloheximida demostraron que la síntesis de proteínas de novo no se requiere para la formación de vacuolas, por lo que se sugiere que las vacuolas no son de tipo autofágico (Figura 22). Basándose en estos resultados se concluye que la muerte celular producida por el compuesto A en Células Hela y SW480 es de tipo necrótica.

#### Control células HeLa sin tratamiento



#### Células HeLa tratadas con el compuesto A

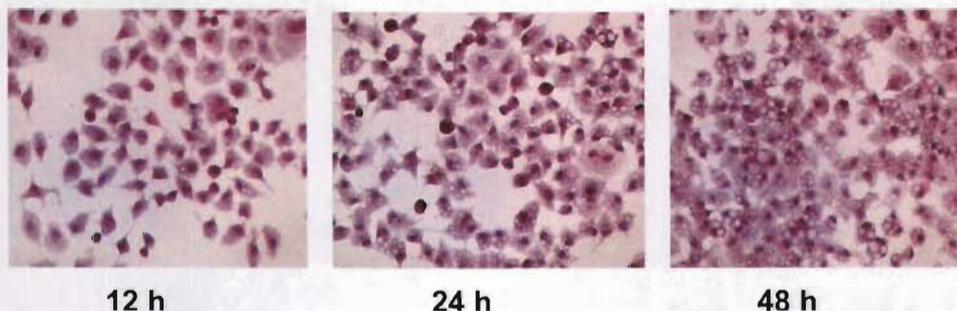
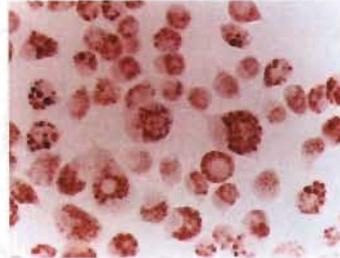


Figura 20. Tinción con hematoxilina de células HeLa sin tratamiento y tratadas con el compuesto A a 10  $\mu$ M a 12, 24 y 48 h de tratamiento, ampliación 20X.

**Las vacuolas inducidas por el compuesto A tienen un contenido ácido.**



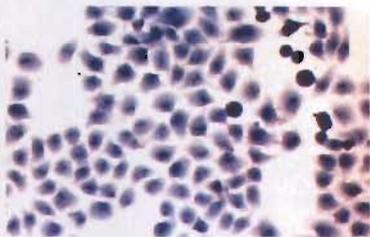
A) Control sin tratamiento



B) Compuesto A

Figura 21. Células HeLa teñidas con el colorante rojo neutro A) células sin tratamiento y B) células tratadas con el compuesto A a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  durante 24 h, ampliación 40X.

**La síntesis de proteínas de novo no es requerida para la inducción de vacuolas, inducidas por el compuesto A en células HeLa**



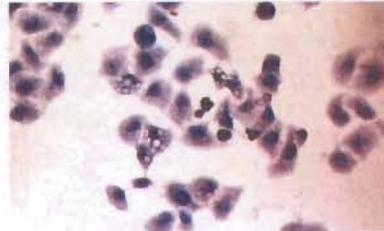
A) Control



B) Compuesto A



C) Cicloheximida



D) Compuesto A y Cicloheximida

Figura 22. Células HeLa A) Control sin tratamiento 24 h, B) Tratadas con el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  por 24 h, C) Tratadas con cicloheximida a 50  $\mu\text{g/ml}$  24 h D) Tratadas con cicloheximida a 50  $\mu\text{g/ml}$  y con el compuesto A a 10  $\mu\text{M}$  simultáneamente por 24 h (Resultados similares se observaron con el pre-tratamiento con cicloheximida). Tinción con hematoxilina, ampliación 40X.

## 9. Discusión.

Una de las actividades biológicas reportadas para algunas chalconas tanto de origen vegetal así como de derivados sintéticos, es la presencia de citotoxicidad en diferentes líneas celulares humanas (Ducki y col 1997; De Vincenzo y col 2000).

La citotoxicidad para moléculas estructuralmente relacionadas a las chalconas de tipo heterodiariliden-ciclohexanonas ha sido reportada. Dimmock y col (1992) sintetizó la (E)-3,5-bis(benciliden)-4-piperidona y obtuvo una  $IC_{50}$  de 10  $\mu M$  en líneas celulares de leucemia. El-Subbagh y col (2000) sintetizaron chalconas similares a las anteriores donde se les sustituyeron grupos heteroarilos en lugar del grupo benciliden, obteniendo valores de  $IC_{50}$  desde 10 hasta 35  $\mu M$  en diferentes líneas celulares.

Los nuevos compuestos: A, B y C son derivados de la reacción entre el 6-amino-1,3-dimetiluracilo y las chalconas de tipo heterodiariliden-ciclohexanonas (Figura 5; Díaz y col 2003 y Martínez-Zúñiga 2001). La propuesta de adicionar dimetil-uracilo a chalconas se basó en estudios previos de Díaz y col (1998) y de Quintero y col (1999), en los que se reportó que en compuestos de tipo lactona sesquiterpénica modificados con 1,3-dimetil-uracilo presentaba propiedades citotóxicas.

Los nuevos derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas A y B presentaron actividad de inhibición de la proliferación en las líneas celulares C-33, HeLa, K-562, MCF-7, SW480, Calo y SW620. El compuesto A presentó  $IC_{50}$  en un rango de 4.4 a 22.2  $\mu M$ , la línea celular más sensible fue SW480. Mientras que para el compuesto B se obtuvieron  $IC_{50}$  en un rango de 8.4 a 37.6  $\mu M$ , la línea celular más sensible fue MCF-7. La citotoxicidad de estos compuestos resulta relevante para estudios posteriores en la regresión de tumores implantados en ratones desnudos.

La diferencia de actividad de inhibición de la proliferación entre los compuestos A y B no se presentó en todas las células, solo en K-562, SW480 y Calo. Si se analiza las diferencias estructurales entre los compuestos A y B se observa que A contiene un ciclohexano en su estructura y B contiene un grupo pirano en la misma posición (Figura 6 y 23).

Por otro lado el compuesto C mostró una actividad citotóxica menor a la de A y B. La  $IC_{50}$  del compuesto C no se determinó en el rango de concentraciones utilizadas de 2.5 a 40  $\mu\text{M}$ , debido a que no se alcanzó 50% de inhibición en ese rango. La diferencia estructural del compuesto C en relación a A y B es que contiene en su molécula un grupo tienil como heteroarilo en lugar de los metil-pirrol contenidos en las estructuras A y B. La presencia del grupo tienil no contribuye a la actividad citotóxica, sugiriendo una posible relación estructura actividad en este tipo de compuestos (Figura 23).

En estudios previos, se reportó la síntesis y la citotoxicidad de heterodiariliden-ciclohexanonas y sus derivados pirimídicos (Martínez-Urbina 2005), los cuales son similares a los compuestos A, B y C. En este reporte se tiene que la heterodiariliden-ciclohexanona con mayor citotoxicidad es la que tiene grupos imidazol. Mientras que para sus derivados pirimídicos el más citotóxico es el que contiene a los grupos metil-tiazolo. Estos resultados apoyan la propuesta de que los compuestos heterodiariliden-ciclohexanona y heterodiariliden-piranona manifiestan una relación estructura actividad, siendo los grupos, metil-pirrol los sustituyentes que le confieren un efecto más citotóxico.

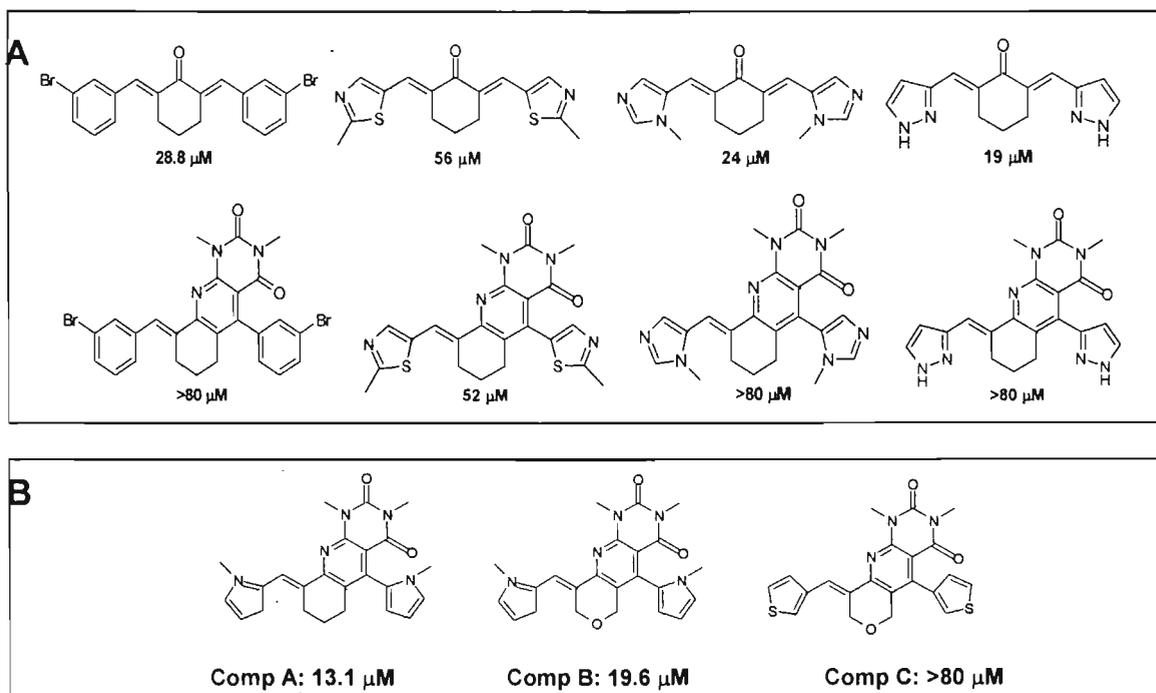


Figura 23. A) Valores de  $IC_{50}$  en células HeLa tratadas con heterodiariliden-ciclohexanona y con sus correspondientes derivados pirimídicos (Martínez-Urbina 2005). B) Valores de  $IC_{50}$  en células HeLa tratadas con los compuestos A, B y C obtenidos en este trabajo.

Los resultados de la tinción por azul tripano en las células HeLa tratadas con el compuesto A, mostraron que el número de células vivas a 24 y a 48 h no cambió significativamente con respecto a 0 h, no obstante a 48 h se observa un ligero aumento en el número de células. Los resultados con MTT mostraron un patrón similar a los obtenidos con el azul tripano. Los resultados obtenidos para células HeLa y de SW480 fueron similares. En base a lo anterior se sugiere que el efecto del compuesto A en la inhibición de la proliferación de células HeLa y SW480 es por citostasis. Sin embargo, la citostasis aún no es concluyente, ya que se requiere comprobar en que fase del ciclo celular ocurre un arresto en la proliferación.

Los resultados obtenidos del análisis por citofluorometría de flujo de células HeLa tratadas con el compuesto A mostraron un ligero aumento significativo, tanto en la fase G1 a 24 como a 72 h con respecto a células no tratadas (Figura 13 y 15A), lo que reflejaría un efecto citostático. Sin embargo, esto no parece ser el caso ya que en primer lugar a 48 h no existe un arresto y en segundo lugar el porcentaje de células que se observa aumentado en la fase G1 a 48 h de acuerdo a la figura 15A, es aproximadamente del 10%, porcentaje que debería ser del 50% ya que en el experimento para el análisis por citofluorometría de flujo las células se trataron con la  $IC_{50}$  del compuesto A.

En base a los resultados anteriores en células HeLa se sugirió que la inhibición en la proliferación celular no se trata de citostasis y se planteó que el efecto que se muestra en realidad es un proceso citotóxico. Por lo tanto, se tuvo que demostrar el tipo de muerte celular que el compuesto A está induciendo.

Los resultados de citofluorometría obtenidos para células SW480 fueron similares a los obtenidos para células HeLa, no obstante en el caso de SW480 si se muestra claramente que no se presentan cambios en las fases del ciclo celular (Figura 14 y 15B), apoyando la ausencia de un efecto citostático. Por otro lado, se observó que el análisis por citofluorometría de flujo no mostró un pico sub-G1 sugerente de apoptosis, en ninguna de las dos líneas celulares analizadas.

Los resultados del análisis de TUNEL demuestran que el compuesto A induce la inhibición de la proliferación celular en ausencia de fragmentación de ADN (Figura 19).

Las proteínas pro- y anti-apoptóticas: P53, Bcl-2, Bax y Caspasa 3 analizadas por western blot, en células Hela tratadas con el compuesto A no presentaron ningún cambio en su expresión, por lo que se concluye que estas proteínas no participan en la inhibición de la proliferación celular y por lo tanto, la citotoxicidad no es por un proceso apoptótico. Lo anterior plantea la posibilidad de que la inhibición en la proliferación sea a través de la inducción de muerte por necrosis.

En todas las líneas celulares tratadas con los compuestos A y B se observó una marcada vacuolización que se presentó desde las primeras horas de tratamiento. Esta vacuolización no ha sido reportada en otros casos de células tratadas con compuestos relacionados estructuralmente a las heterodiariliden-ciclohexanas. Sin embargo, para compuestos como la procainamida se ha reportado que inducen vacuolización en líneas celulares de pulmón (Morissette y col 2004), ó el compuesto kahalalide F en líneas PC3 y MCF-7, en el cual su citotoxicidad se asocio con la presencia de una intensa vacuolización de las células, en ausencia de apoptosis (Suárez y col 2003). Los estudios de este compuesto se encuentran en fase clínica I en pacientes con cáncer de próstata (Ciruelos y col 2002).

En relación al mecanismo de la vacuolización se conoce que la procainamida contiene una amina terciaria la cual se requiere para la inducción de la vacuolización, además ésta amina terciaria es la responsable de la internalización de la molécula a la célula (Morissette col 2004). En el caso de las heretodieriliden-ciclohexanonas A y B éstas contienen una amina terciaria en el grupo heteroarilo metil-pirrol, que pudiera conferir un efecto parecido al de compuestos de tipo procainamida.

El conjunto de los resultados expuestos anteriormente demuestran que la citotoxicidad del compuesto A se lleva a cabo por necrosis, esto último fue demostrado por la determinación de la actividad de LDH liberada hacia el medio de cultivo, en células Hela, SW480 y MCF7 tratadas con el compuesto A, además de que fue demostrada ampliamente la ausencia de apoptosis.

## 10. Conclusiones.

- 1) Los nuevos compuestos derivados de heterodiariliden-ciclohexanonas A y B inducen inhibición de la proliferación celular en líneas celulares humanas por una actividad citotóxica.
- 2) La presencia de los sustituyentes metil-pirrol en los derivados heterodiariliden-ciclohexanonas A y B está asociada a una mayor citotoxicidad a diferencia del grupo tienil del compuesto C, en el cual disminuyo su actividad citotóxica.
- 3) El tipo de muerte celular de las células Hela, MCF-7 y SW480 tratadas con el compuesto A se llevó a cabo por muerte necrótica.

## 11. Bibliografía.

Abdel Latif MM, O'Riordan J, Windle HJ, Carton E, Ravi N y Kelleher D (2004). NF-kappaB activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg*, 239: 491-500.

Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, Feyes DK y Mukhtar H (2001). Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G1-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res*, 7:1466-1473.

Ashkenazi A (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature Rev Cancer*, 2: 420-430.

Ashkenazi A y Dixit VM (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281:1305-1308.

Barrera R y De la Garza JG (2000). Biología molecular del cáncer. Manual de oncología: procedimientos médico quirúrgico del Instituto Nacional de cancerología. Editorial Mc Graw-Hill interamericana. Editor Ángel herrera Gómez. Capítulo 3, pag 16-35.

Bois F, Beney C, Boumendjel A, Mariotte AM, Conseil G y Di Pietro A (1998). Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein. Potential modulators of Multidrug Resistance. *J Med Chem*, 41: 4161-4164.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierrot G, Codogno P y Kroemer G (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol and Cell Biol*, 25: 1025-1040.

Brown ST, Hirst GL, Gallager WM, McIlwrath AJ, Margison GP y Van der Zee AG (1997). hMLH1 expression and cellular responses of ovarian tumour cells to treatment with cytotoxic anticancer agents. *Oncogene*, 15: 45-52.

Burkhart CA, Kavallaris M y Band-Horwit S (2001). The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimitotic drugs. *Biochim Biophys Acta*, 1471: 1-9.

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD y Mitchell JB (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res*, 47: 943-946.

Ciruelos C, Trigo T, Pardo J, Paz-Ares L, Estaun N, Cuadra C, Domínguez M, Marín A, Jimeno J y Izquierdo M (2002). A phase I clinical and pharmacokinetic (PK) study with Kahalalide F (KF) in patients (pts) with advanced solid tumors (AST) with a continuous weekly (W) 1-hour iv infusion schedules. 14<sup>th</sup> EORT-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Frankfurt, Germany. November 19-22<sup>nd</sup> abstract 95. *Eur J Cancer*, 38 (Suppl. 7): S33.

Clark PG (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanism. *Anat. Embryol*, 1981: 195-213.

Costantini P, Decaudin D y Kroemer G (2000). Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 92: 1042-1050.

Cummings BS, McHowat J y Schnellmann RG (2000). Phospholipase A2 in cell Injury and death. *J Pharmacol Exp Ther*, 294: 793-799.

Dal Canto MC y Gurney ME (1994). Developmental of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol*, 145: 1271-1279.

Deffie AM, McPhersons JP, Gupta RS, Hedley DW y Goldenberg GJ (1992). Multifactorial resistance to antineoplastic agents in drugs resistance p388 murine leukemia, Chinese hamster ovary, and human Hela cells, with emphasis on the role of DNA Topoisomerase II. *Biochem Cell Biol*, 70: 354-364.

De Vincenzo R, Ferlini C, Distefano M, Caggini C, Riva A, Bombardelli E, Morazzoni P, Piero V, Belluti F, Ranelletti F, Mancuso y Scambia G (2000). In vitro evaluation of newly developed chalcone analogues. *Cancer Chemother Pharmacol* 46: 305-312.

Diasio RB y Harris BE (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*, 16: 215-237.

Díaz E, Guzmán A, Toscano RA, Toscano, Barrios H, Corona D, Fuentes A, Díaz R, Martínez-Zuñiga, y Quintero A (2003).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  2D NRM Aand X-ray studies of the products of the reaction between dibenzylidencyclohexanone and 6-amino-1,3-dimethyl uracil. *Spectrochimica Acta Part A*. 59: 1307-1320.

Díaz E, Nava JL, Barrios H, Quiroz B, Guzmán A, León GL y Fuentes BA (1998). 2D  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR evidence for stereoselective formation of a new bond C-N, C-S.or C-C in the reaction of ivalin acetate with substituted pyrimidines. *Spectrochimica Acta part A*, 54: 567-574.

Dimmock JR, Arora VK, Duffy MJ, Reid RS, Allen TM y Kao GY (1992). Evaluation of some N-acyl analogues of 3,5-Bis(arylidene)-4-piperidones for citotoxic activity. *Drugs Des. Discovery*, 8: 291-299.

Dimmock JR, Raghavan SK, Logan BM y Bigam GE (1983). Antileukemic evaluation of some mannich bases derived from 2-arylidene-1,3-diketones. *Eur J Med Chem*, 18: 248-254.

Ding XZ, Iversen P, Cluk M, Knezetiv KA y Adrian TE (1999a). Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 261: 218-223.

Ding XZ, Kuszynski CA, El-Metwally TH y Adrian TE (1999b). Lipoxygenase inhibition induced apoptosis, morphological changes, and carbonic anhydrase expression in human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 266: 392-399.

Ducki S, Hadfield JA, Hepworth LA, Lawrence NJ, Liu C y McGown AT (1997). Synthesis and cell growth inhibitory properties of substituted (E)-1-(phenylbut-1-en-3-ones. *Bior Med Chem Lett*, 7: 3091-3094

- Ducki S, Hadfield JA, Hepworth LA, Lawrence NJ, Liu C, MCGOWN AT y Zhang X (1996). Isolation of (E)-1-(4'-hidroxyphenyl)-but-1-en-3-one from *Scutellaria barbata*. *Planta Med*, 62: 185-186.
- Edwards ML, Stemerick DM y Sunkara PS (1990). Chalcones: a new class of antimitotic agents. *J Med Chem*, 33:1948-1954.
- Eguchi Y, Shimizu S y Tsujimoto Y (1997). Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*, 57: 1835 1840.
- El-Barbary AA, Khodair AI, Pederson EB y Nielsen C (1994). S-Glucosylated Hydantoins as new antiviral agents. *J. Med. Chem*, 37: 73-77.
- El-Subbagh HI, Abu-Zaid SW, Marahn Mona A, Badria FA y Al-Obaid AM (2000) Sintesis and biological ealuation of certain  $\alpha,\beta$  insaturated ketones and their corresponding fused pyridines as antiviral and citotoxic agents. *J Med Chem*, 43: 2915-2921.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA y Henson PM (2000). A Receptor for Phosphatidylserine-specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature*, 405: 85-90.
- Fay MP, Freedman LS, Clifford CK y Midthune DN (1997). Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review. *Cancer Res*, 57: 3979-3988.
- Fernandez-Prada CM, Hoover DL., Tall BD y Venkatesan MM (1997). Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri* in vitro undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect Immun*, 65: 1486-1496.
- Gong J, Traganos F y Darzynkiewicz Z (1994). A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem*, 218: 314-319.
- Gorczyca W, Gong J y Darzynkiewicz Z (1993). Detecion of DNA Stran breaks in individual apoptotic cell by the *in Situ* terminal deoxinucleotidiyl transferasa and nick translation assay. *Cancer Research*, 53: 1945-1951.
- Gozuacik D y Kimchi A. (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23: 2891-2806.
- Gross A, Jockel J, Wei MC y Korsmeyer SJ (1998). Enforced dimerization of Bax result in Its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J*, 171: 3878-3885.
- Guengerich FP (1988). Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 1988. 48: 2946-2954.
- Guo W, Healey JH, Meyers PA, Ladanyi M, Huvos AG y Bertino JR (1999). Mechanism of methotrexate resistance in osteosarcoma. *Clin Cancer Res*, 5: 621-627.

- Harborne JB y Williams CA (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55:481-504.
- Hengartner MO (2000). The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*, 407: 770-776.
- Gottesman MM, Fojo T y Bates SE (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporter. *Nature Rev Cancer*, 2: 48-58.
- Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M y Kroemer G (1997). The Apoptosis-necrosis Paradox. Apoptogenic Proteases Activated After Mitochondrial Permeability Transition Determine the Mode of Cell Death. *Oncogene*, 15: 1573-1581.
- Hoffman K (1999). The Modular Nature of Apoptotic Signaling Proteins. *Cell Mol Life Sci* 55: 1113-1128.
- Huang WP y Klionsky DJ (2002). Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct*, 27: 409-420.
- Instituto nacional de estadística geografía e informática, Reporte. México en corto (2005) 4 de Febrero día mundial contra el cáncer. <http://www.INEGI.gob.mx/est/contenidos/español/proyectos/coesme/programas/ficha.asp>
- Jacobson MD, Weil M y Raff MC (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, 88: 347-354.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, y Pezzuto JM (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275: 218-220.
- Jhonston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV y Allegra CJ (1995). Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal y gastric tumors. *Cancer Res*, 55: 1407-1412.
- Jonas D, Walev I, Berger T, Liebertrau M, Palmer M y Bhakdi S (1994). Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal alpha-toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infectol Immun* 62, 1304-1312.
- Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, y Wilson L (1996). Mitotic block induced in Hela cells by low concentrations of paclitaxel (taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res*, 56: 816-825.
- Kimura K, Hirano M, Kobayashi R y Hirano T (1998). Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 *in vitro*. *Science*, 282: 487-490.
- Kroemer G (2004). Cell death and cancer: an introduction. *Oncogene*, 23: 2744-2745.

Kumar SK, Hager E, Pettit C, Gurulingappa H, Davidson NE y Khan SR (2003). Design synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcones derivatives as antitumor agents. *J Med Chem*, 46: 2813-2815.

Kuwashima Y (1996). Cytomorphology of murine B16 melanoma in vivo after treatment with Cyclophosphamide: evidence of "oncotic" cell death. *Anticancer Res*, 16: 2997-3000.

Lawrence NJ, McGown, Ducki S y Hadfield A (2000). The interaction of chalcones with tubulin. *Anti-Cancer Drug Design*, 15: 135-141.

Lawrence PB y Brawn WJ (1993). Inhibition of protein synthesis separates autophagic sequestration from the delivery of lysosomal enzymes. *Journal of cell Science*, 105: 473-480.

Levine B y Klionsky DJ (2004), Development by self-digestion: molecular mechanism and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, 6: 463-477.

Longley DB y Johnston PG (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, 205: 275-292.

Lopez-Marure R, Gutierrez G, Mendoza C, Ventura JL, Sanchez L, Reyes Maldonado E, Zentella A, Montano LF (2002). Ceramide promotes the death of human cervical tumor cells in the absence of biochemical and morphological markers of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 293:1028-1036.

Lowe SW y Lin AW (2000). Apoptosis in Cancer, *Carcinogenesis* 21: 485-495.

Majno G y Joris (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 146: 3-15.

Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A y Mori H (1996). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res*, 56: 4904-4909.

Martínez-Urbina MA (2001). Efecto apoptótico del derivado pirimidico de una lactona sesquiterpénica (III JLNZ-106) en la línea celular tumoral HeLa. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química. UNAM.

Martinez-Urbina MA (2005). Síntesis y evaluación del efecto citotóxico de nuevas 2,6-diarilidenciclo-hexanonas y sus compuestos de reacción con el 6-amino-1,3-dimetiluracilo. Tesis de maestría en ciencias químicas. Facultad de Química. UNAM.

Martínez-Zuñiga E. C. Reacción del 1,3-dimetiluracilo sobre sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados derivados de cicloalcanonas heterosustituidas. Tesis de licenciatura, para obtener el grado de Químico. Universidad Autonoma del Estado de México.

Marzella L y Glaumann H (1980). Increased degradation in rat liver induced by vinblastina. I. Biochemical characterization. *Lab Invest* 42: 8-17.

- Masuda M, Toh S, Koike K, Kuratomi Y, Suzui M y Deguchi A (2002). The roles of JNK1 and Stat3 in the response of head and neck cancer cell line to combined treatment with all-trans-retinoic acid and 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res*, 93:329-339.
- Mitra R, Figueroa P, Mukhopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE y Nair GB (2000). Cell vacuolation, a manifestation of the El tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 68: 1928-1933.
- Miyashita T y Reed JC. (1992). bcl-2 gene transfer increases relative resistance of S49.1 and WEH17.2 lymphoid cell death and DNA fragmentation induced by glucocorticoids and multiple chemotherapeutic drugs. *Cancer Res*, 52: 5407-5411.
- Mohar A (2000). Epidemiología del cáncer. Manual de oncología: procedimientos médico quirúrgico del Instituto Nacional de cancerología. Editorial Mc Graw-Hill interamericana. Editor Ángel herrera Gómez, Capítulo 2, pag 9-15.
- Morissette G, Moreau E, Gaudreault RC. y Marceau F. (2004). Massive cell vacuolization induced by organic amines such as procainamide. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310: 395-406.
- Mossman T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 65: 55-63.
- Nicholson KM y Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, 14: 381-395.
- Nigg EA (1995) Cyclin –dependent protein kinases: key regulators of the of the eukaryotic cell cycle . *Bioessay*, 17: 471-480.
- Noda T y Ohsumi Y (1998). TOR a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem*, 273: 3963-3966.
- Noton E y Diffley JF (2000). CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol cell*, 1: 3-11.
- Okada H y Mak TW (2004). Pathways of apoptotic and non.apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4: 592-603.
- Oliva O, Rez G, Palfia A y Fellingner E (1992). Dynamics of vinblastine-induced autophagocytosis in murine pancreatic acinar cells: influence de cicloheximide post-treatments. *Exp Mol Pathol*, 56: 76-86.
- Pegram MD, Finn RS, Arzoo K, Beryt M, Pietras RJ y Slamon DJ (1997). The efect of HER-2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene*. 15: 537-547
- Phelps PC, Smith MW y Trupmp BF (1989). Cytosolic ionized calcium and bleb formation after acute cell injury of cultured rabbit renal tubule cells. *Lab Invest*, 60: 630-642.

- Quintero A, Pelcastre A, Solano JD, Guzmán A y Díaz E. (1999). Antitumoral Activity of Sesquiterpene Lactones. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2: 108-112.
- Real PJ, Sierra A, De Juan A, Segovia JC, López Vega JM y Fernandez-Luna JL (2002). Resistente to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells. *Oncogene*, 21: 7611-7618.
- Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG y Sancar A (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexilamine-platinum (IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res*, 59: 3968-3971.
- Reed JC, Jurgensmeier JM y Matsuyama S (1998). Bcl-2 Family Proteins and Mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1366: 127-137.
- Reiter I, Krammer B. y Schwamberger G (1999). Differential Effect Of Apoptotic Versus Necrotic Tumor Cells on Macrophage Antitumor Activities. *J Immunol*, 163: 1730-1732.
- Rodhe J, Heitman J y Cardenas ME (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem*, 276: 9583-9586.
- Russell P y Nurse P (1986). Cdc25 functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45: 145-153.
- Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S y Tsujimoto H (1997). Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposido. *Surg today*, 1002: 90-94.
- Sapirstein A y Bonventre JV (2000). Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A(2) as defined by gene knockouts. *Biochim Biophys Acta*, 1488: 139-148.
- Satomi Y (1993). Inhibitory effects of 3'-methyl-3-hydroxy-chalcone on proliferation of human malignant tumor cells and on skin carcinogenesis. *Int J Cancer*, 55: 506-514.
- Schweichel JU y Merker HJ (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, 7: 253-266.
- Sen S. y D'Incalci M (1992). Apoptosis, Biochemical Events and Relevance to Cancer Chemotherapy. *FEBS Lett*, 307: 122-127.
- Sionov RV y Haupt Y (1999). The Cellular Response to p53: the Decision Between Life and Death. *Oncogene*, 18: 6145-6157.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Otilie S, Bullrich F, Banks S y Wang Y (1997). Flame -1 a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 272: 18542-18545.
- Stoll R, Renner C, Hansen S, Palme S, Klein C, Belling A, Zeslawski W, Kamiona M, Rhem T, Mühlhahn P, Schumacher R, Hesse F, Kaluza B, Voelter W, Engh RA y Holak TA (2001). Chalcone derivatives antagonize interactions between the human oncoprotein MDM2 and p53. *Biochem*, 40: 336-334.

Suárez Y, González L, Cuadrado A, Berciano M, Lafarga M y Muñoz A (2003). Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2:862-872.

Takabe N, Zhao SC, Ural AU, Jhonson MR, Banerjee D, Diasio RB y Bertino JR (2001). Retroviral transduction of human dihydropyridine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+ enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther*, 8: 966-973.

Tamm I, Wang Y, Saussville E, Scudiero DA, Vigna N y Oltersdorf T (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases and anti-cancer drugs. *Cancer Res*, 58: 5315-5320.

Thomas H y Coley HM (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control*, 10: 159-165.

Towbin H, Staehelin T y Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 4350-4354.

Trump BF, Berezsky IK, Chang SH y Phelps PC (1997). The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol Pathol*, 25, 82-88.

Ueda S, Nakamura H, Masutani H, Sasada T, Takabayashi A, Yamaoka Y y Yodoi J (2001). Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. *Mol Immunol* 38: 781-791.

Weinberg RA (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res*, 49: 3713-3721.

Won SJ, Liu CT, Tsao LT, Weng J R, Ko HH, Wang JP y Lin CN (2005). Synthetic chalcones as potential anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *Eur J Med Chem*, 40: 103-112.

Woo M y Mak TW (1998). Essential Contribution of Caspase 3/CPP32 to Apoptosis and its Associated Nuclear Changes. *Genes Dev*, 12: 806-819.

Xia Y, Yang ZY, Xia P, Bastow KF, Nakanishi Y y Lee KH (2000). Antitumor agents. Part 202: Novel 2'-amino chalcones: design, synthesis and biological evaluation. *Bioorganic & Med Chem Lett*, 10: 699-701.

Xu Y y Villalona-Calero MA (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann Oncol*, 13: 1841-1851.

Yang EB, Wang DF, Cheng LY y Mack P (1997). Expression and functions of growth factors and growth factor receptors in liver cancer. *Cancer Journal*, 10: 319-324

Yang EB, GuoYJ., Zhang K, Chen YZ, and Mack P (2001). Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochem and Biophys Act*, 1550: 144-152.

Young CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chung MH, et al (2004). Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 TO protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res*, 64: 4849-4857.

Zhang. CH, Xu YH, Gu JJ, y Schlossman SF (1998). A cell surface receptor defined by a mAb mediates a unique type of cell death similar to oncosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 6290-6295.

Zoya N, Blagosklonny D y Blagosklonny M (2004). Flavopiridol induce p53 via initial inhibition of Mdm2 and p21 and , independently of p53, sensitizes apoptosis-reluctant cells to tumor necrosis factor. *Cancer Res*, 64: 3653-3660.