

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Actividad citotóxica de nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares tumorales.

Título de:
Químico Farmacéutico-Biólogo

Presenta:

Camacho Ramírez, Adriana

Asesor. Solano Becerra, José Dolores

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno.

Camacho

Ramírez

Adriana

21579309

Universidad Nacional Autónoma de México

:Facultad de Química

Químico Farmacéutico-Biológica

2. Datos del Asesor.

Solano

Becerra

José Dolores

3. Datos de la tesis.

Actividad citotóxica de nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares tumorales.

:67 p

2006

CONTENIDO

	Página
Abreviaturas	1
I. Antecedentes	2
II. Introducción	
2.1. Cáncer	4
2.2. Carcinogénesis	6
2.3. Apoptosis	8
2.4. Tratamiento del cáncer	10
2.5. Fármacos antineoplásicos	11
2.6. Topoisomerasa II	17
2.7. Compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina	20
III. Objetivos	27
IV. Hipótesis	28
V. Materiales y métodos	
5.1. Soluciones	29
5.2. Métodos	35
5.2.1. Mantenimiento celular	35
5.2.2. Conteo celular	36
5.2.3. Determinación de la citotoxicidad de cada uno de los compuestos derivados de tiazolo [5,4-b]quinolina	37
5.2.4. Fijación celular	40
5.2.5. Tinción de hematoxilina-eosina para observar la morfología celular	40
5.2.6. Técnica de TUNEL	41
5.2.7. Fragmentación de ADN en geles de agarosa	42
VI. Resultados	
6.1. Evaluación citotóxica por medio de la técnica de MTT	44
6.2. Efecto en la morfología en células HeLa tratadas con el compuesto 2	50
6.3. Fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL	51
6.4. Fragmentación de ADN por electroforesis en geles de agarosa	53
VII. Discusión	54
VIII. Conclusiones	58
IX. Perspectivas	59
X. Bibliografía	60

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
pb	Pares de bases
c.b.p	Cuanto baste para
col	Colaboradores
DMSO	Dimetil sulfóxido
D-MEM	Medio Eagle modificado de Dubelcco
DS	Desviación estándar
ejem	Ejemplo
<i>G</i>	Número de veces que se incrementa la fuerza centrífuga
h	Horas
H/E	Hematoxilina-eosina
HEPES	Ácido N(2-hidroxiethyl) piperazin N´-(2 etanosulfónico)
IC ₅₀	Concentración del compuesto que inhibe el 50% de la proliferación celular
Fig	Figura
min	Minutos
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos pH =7.4 (KCL 2.6 mM, NaCl 136.9 mM, KH ₂ PO ₄ 1.7 mM, Na ₂ HPO ₄ 10.1 mM)
PBS –EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiaminotetracético (PBS, EDTA sódico 0.9 mM)
SDS	Dodecilsulfato de sodio o laurilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
TBE	Trisborato/EDTA
Topo I	Topoisomerasa I
Topo II	Topoisomerasa II
TUNEL	Terminal deoxinucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling (marcaje de los extremos de ADN fragmentados con dUTP mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa Terminal)

I. ANTECEDENTES

El cáncer no se refiere a una enfermedad si no a un conjunto de ellas, las cuales se caracterizan por una división celular anormal y descontrolada. El cáncer inicia como un tumor primario, sin embargo, en algún punto las células se separan del tumor y viajan a través del torrente sanguíneo y vasos linfáticos ocurriendo así el proceso de metástasis regional y/o a distancia, provocando finalmente la muerte del individuo.^{1,2} Es una enfermedad de origen genético causada por factores físicos, químicos y/o biológicos. Actualmente es la segunda causa de muerte en México y en el mundo.³

Uno de los tratamientos que ocupa un lugar preponderante en el tratamiento contra los tumores malignos es la quimioterapia. Generalmente también se emplea en combinación con radioterapia, cirugía o inmunoterapia, lo que permite el aumento en el éxito del tratamiento.⁴ Sin embargo uno de los principales problemas que se presentan en el tratamiento del cáncer con quimioterapia es la resistencia a la misma, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales con mejores propiedades de selectividad y efectividad es relevante. En los últimos años se ha intensificado la investigación para la obtención de nuevos fármacos, para ser utilizados en la clínica oncológica. Muchos de estos compuestos provienen de compuestos naturales o sintetizados en el laboratorio.

La actividad antitumoral de diversos compuestos tricíclicos ha sido estudiada, particularmente, las 9-aminoacridinas, 9-alquilaminoacridinas o las 9-amilaminoacridinas con o sin sustituyentes en la posición 3, 4, y 5. La actividad de estos compuestos parece estar relacionada con su interacción con el ADN. Un ejemplo es la amsacrina (N-4[-9-acridilamino]-3-metoxifenil]metanosulfonamida), un potente fármaco antileucémico y moderado agente intercalador de ADN.⁵

Álvarez Ibarra y col. propusieron un nuevo tipo de compuestos, sintetizaron varios derivados de 9-hidroxi o 9-alquilaminotiazolo[5,4-b]quinolina y al evaluar su actividad citotóxica ésta resultó ser favorable. La sustitución isostérica de un anillo de benceno del núcleo de la acridina por un anillo tiazolo que planteó en los compuestos sintetizados, originó un nuevo tipo de agentes potenciales antitumorales.^{5,6}

Continuando el trabajo de Álvarez Ibarra, Lira Rocha y col. han realizado la síntesis de varios compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. Algunos de ellos mostraron buena actividad citotóxica en líneas celulares humanas.⁶

Recientemente Lira Rocha ha reportado una nueva generación de agentes intercaladores de tipo tiazolo[5,4-b]quinolina con modificaciones estructurales en las posiciones 9 y 2.

En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación citotóxica de cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en las líneas celulares humanas HeLa y CaLo de adenocarcinoma de cervix, MCF-7 de cáncer de mama, K-562 de leucemia, SW620, y SW480 de cáncer colorrectal, así mismo se propone que el tipo de muerte celular es de tipo apoptótico.

II. INTRODUCCIÓN

2.1. Cáncer.

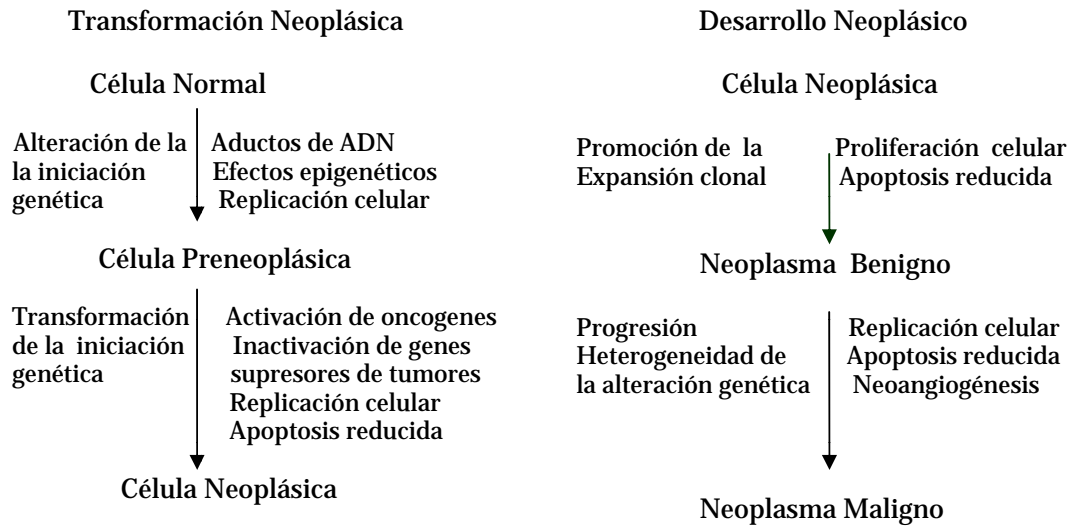
Bajo el término cáncer se agrupan un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación excesiva y descontrolada de las células,^{1,2} que en ocasiones puede ser rápida o lenta pero en ambos casos no se detiene,⁷ invaden y dañan tejidos y órganos,¹ provocando finalmente la muerte del individuo.⁴

En la actualidad el cáncer es la segunda causa de muerte en México y en el mundo, y es la principal causa de muerte en niños de 1 a 14 años.^{3,8,9} Solo las enfermedades cardiovasculares superan al cáncer como causa de fallecimientos.^{1,10,11}

El cáncer puede definirse como la pérdida de la regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma celular que afecta la expresión o función de genes que principalmente controlan el crecimiento y la diferenciación celular además de la muerte celular lo que produce expansión y heterogeneidad clonal.^{12,13,14,15} Es una enfermedad caracterizada por un desequilibrio entre la división y la muerte celular.¹⁶

El cáncer comienza como un tumor primario, sin embargo en algún punto las células se separan del tumor primario y son transportadas por el sistema linfático o por la sangre, alcanzan lugares alejados del organismo, donde se dividen y forman tumores secundarios y a este proceso se le conoce como metástasis.^{1, 2,17,18}

Para que se lleve a cabo la transformación de células normales a cancerígenas se requieren al menos de tres pasos que son: la iniciación, que se entiende como el conjunto de eventos que dan lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto con células contiguas; la promoción que se refiere a la perpetuación del daño celular, por la activación de oncogenes o inactivación de supresores tumorales y finalmente la progresión, donde la progresión de células premalignas producen nuevos clones con incremento en la capacidad proliferativa, invasiva y potencial metastático (Cuadro1).^{19,20,21,22} La invasión hacia tejidos normales por células tumorales es el motivo por el cual el cáncer es letal.^{1,18,23}



Cuadro 1. Formación de las células neoplásicas. Las células neoplásicas se caracterizan por pérdida de las siguientes características: inhibición de crecimiento por contacto, capacidad de anclaje y crecimiento ordenado (anaplasia).²⁰

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal,¹⁰ los diferentes tipos de cáncer se clasifican en función del tejido y célula de origen.⁴ En el ser humano se han reconocido y clasificado más de 100 tipos distintos de cáncer de acuerdo a su origen (cuadro 2),²¹ siendo tres los principales subtipos:

- a) Sarcomas: son de origen mesodérmico, derivan de células del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios y vasos sanguíneos, así como de tejido muscular y tejido adiposo.
- b) Carcinomas: son de origen ectodérmico y endodérmico, los carcinomas de estructura similar a la piel se denominan carcinomas de células escamosas, los que tienen una estructura glandular se denominan adenocarcinomas. Los carcinomas incluyen algunos de los cánceres más frecuentes. La falta de tratamientos eficaces para los carcinomas radica en la gravedad de alguno de ellos, como los melanomas, que adquieren rápidamente la capacidad metastásica y son generalmente fatales.¹
- c) Por último están los originados por células del torrente sanguíneo como las leucemias, linfomas y mielomas.¹

	ORIGEN	TUMORES REPRESENTATIVOS
Derivados endodérmicos	Piel Glándula mamaria Neuronas Células de la glia Células de la retina Melanocitos	Carcinoma de las células basales Carcinoma de mama Neuroblastoma Glioblastoma Retinoblastoma Melanoma
Derivados mesodérmicos	Hueso Tejido fibroso Cartilago Músculo Vaso sanguíneo Células adiposas Eritrocitos Linfocitos	Osteosarcomas Fibrosarcomas Condrosarcomas Rabdomiosarcomas Hemangiosarcomas Liposarcomas Leucemia eritrocítica Leucemia linfocítica y linfoma
Derivados ectodérmicos	Vejiga urinaria Páncreas Colon Pulmón Tiroides Higado	Carcinoma de vejiga Carcinoma de páncreas Carcinoma de colon Carcinoma de pulmón Carcinoma de tiroides Carcinoma hepático

Cuadro 2. Ejemplos de tumores humanos según se origen.²²

2.2. Carcinogénesis

La carcinogénesis puede ser vista como un proceso que exhibe una evolución celular acelerada pero anormal, donde la información que controla la proliferación, diferenciación y apoptosis es transformada bajo una atmósfera ambiental selectiva.²⁴ Las células normales sufren daño genético vía mutación somática o germinal.^{25,26}

Sea cual fuere la causa inicial por la que una célula normal se transforma en cancerosa y transmite a su descendencia esta alteración, es necesario que esta modificación se encuentre impresa en su ADN.²⁷

Un carcinógeno es un agente que produce neoplasia o la induce.²⁶ Los factores que originan el cáncer se pueden dividir en dos grupos: los factores exógenos que constituyen de un 80-90% de los casos y los factores endógenos (por factor hereditario), que forma del 10-20% restante.

Los factores exógenos se dividen en cuatro grupos: compuestos químicos, factores físicos, biológicos y sociales; y a su vez estos se clasifican en genotóxicos, es decir que causan daño al material genético de la célula (ADN), o no genotóxicos, los cuales actúan al nivel de factores que estimulan la proliferación celular (no actúan directamente sobre ADN),^{25,28,29} ya que al aumentar la capacidad proliferativa de las células, también se aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones en el ADN que deriven en cambios en la diferenciación de la célula (Cuadro3).^{29,30}

1.- Químicos	{ Genotóxicos No Genotóxicos
2.- Físicos	{ Radiaciones. Genotóxicos
3.- Biológicos	{ Virus. Genotóxicos Bacterias. No Genotóxicos
4.- Sociales	{ Estrés Depresiones profundas

Cuadro 3. Factores exógenos que causan cáncer.^{7,28,30}

En el caso de los factores sociales se ha demostrado que causan inmunodepresión, lo que deriva en la falta de reconocimiento de las células malignas por el sistema inmunológico y permite su proliferación y propagación.⁷

2.3. Apoptosis

La muerte celular generalmente es clasificada en dos categorías nombradas necrosis y apoptosis.^{31,32} Ambos tipos de muerte celular tienen características funcionales, morfológicas y mecanismos que las diferencian³³ y que a la vez son definitorias de cada tipo de muerte celular.³⁴ La necrosis, también conocida como muerte celular patológica, es un proceso que ocurre cuando la célula está expuesta a un daño por factores externos. Esta muerte celular "accidental" ocurre como respuesta a una gran variedad de condiciones extremas (ejem. hipertermia, hipoxia., entre otros) o agentes que producen un daño en la membrana plasmática (complemento, virus).^{34,35} La necrosis es un proceso "pasivo".²⁴ Se caracteriza por daño mitocondrial, ruptura de la membrana, lisis celular y liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular.^{32,34} Contrariamente, la apoptosis también conocida como "muerte celular programada", es un proceso activo que requiere síntesis proteica, la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. El término de apoptosis deriva del griego *apo* que significa separación o derivación y *ptosis*, caída, que describían el desprendimiento de las hojas del árbol en otoño y fue adoptado en el año de 1972 por Kerr, Wyllie y Currie para designar la muerte celular fisiológica. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbujeo de la membrana celular. Durante el proceso final ocurre fragmentación del ADN debido a una ruptura internucleosomal del ADN, se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados por macrófagos sin evidencia de reacción inflamatoria (fig. 1).^{32,35,36,37}

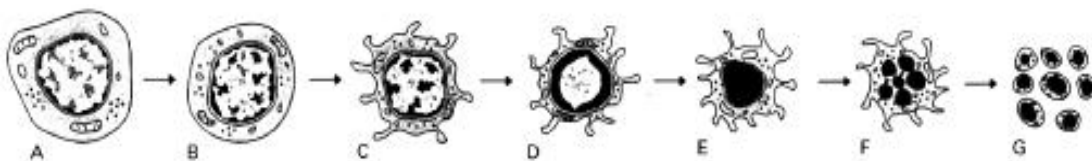


Fig. 1. Fases del proceso apoptótico. A) Célula normal. B) Disminución del volumen celular. La cromatina se empieza a condensar. C) Aparecen repliegues en la membrana plasmática a consecuencia de sus deformaciones. D) La cromatina se dispone en la periferia del núcleo mientras que el volumen celular sigue disminuyendo. E) Fragmentación de la cromatina. La membrana nuclear mantiene su integridad. F) Fragmentación del núcleo. G) Fragmentación celular. Se forman los cuerpos apoptóticos compuestos por membrana plasmática que engloba material nuclear y citoplasmático.²¹

En la apoptosis además de las características morfológicas mencionadas se han caracterizado una serie de cambios y procesos histológicos y bioquímicos respectivamente, como son la reorganización de los microfilamentos de actina (que altera la arquitectura de la célula) y el desenganche de la célula de sus células vecinas y activación de endonucleasas dependientes de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que fragmentan el ADN genómico por los espacios internucleosomales,²¹ generándose fragmentos múltiples de 180 pares de bases.³⁸ También hay disminución en el potencial de membrana mitocondrial. En la membrana plasmática ²¹ los residuos de fosfatidilserina normalmente presentes en la cara interna de la membrana celular, aparecerán también en la cara externa,³⁹ lo que permite el reconocimiento de estas células apoptóticas por los macrófagos y su fagocitosis.²¹

El proceso apoptótico puede ser dividido en tres etapas:

La primera fase es la iniciación, en la cual la célula recibe el estímulo que la conduce a la muerte; en la segunda o de ejecución se dan la mayoría de los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis, y por último, en la tercera etapa llamada de eliminación los restos celulares son degradados por los macrófagos y células adyacentes.⁴⁰

La apoptosis juega papeles muy importantes en varios sistemas biológicos tales como la respuesta inmune, hematopoyesis, desarrollo embrionario y carcinogénesis.^{41,42}

2.3.1. La apoptosis y la terapia antitumoral

La muerte celular apoptótica es un fenómeno que ha tomado gran importancia en los últimos años, debido principalmente a las implicaciones que tiene en la vida de los organismos desde que son concebidos hasta que mueren, es importante el papel que tiene en ciertas enfermedades como son enfermedades infecciosas, autoinmunes, neurodegenerativas y cáncer entre otras.⁴⁰

La apoptosis defectuosa representa un factor causal considerable en el desarrollo y progresión de cáncer. La habilidad de las células tumorales para evadir el proceso apoptótico puede jugar un papel muy importante en su resistencia al régimen terapéutico convencional,⁴³ por lo que resulta de enorme utilidad la búsqueda de agentes que sean capaces de inducir la apoptosis en estas células.³²

2.4. Tratamiento del cáncer.

Cirugía

La cirugía tiene el objetivo de extirpar totalmente el tumor. Sigue siendo la mejor opción en la mayoría de los cánceres y se puede aplicar en combinación con la radioterapia, la quimioterapia y la hormonoterapia como tratamientos adyuvantes. Lamentablemente, su uso está limitado a unos cuantos tumores sólidos y su eficacia depende en gran parte de la existencia o no de metástasis⁴.

Radioterapia

La radioterapia consiste en la irradiación con rayos X y rayos γ de las células malignas. Con su uso se pretende impedir la proliferación de las células y suele ir asociada a la cirugía. Es una terapia localizada que se fundamenta en la inducción de daño molecular en células tumorales al ser irradiadas. Las lesiones directas en el DNA son las realmente responsables del éxito, aunque no deja de ser una arma de doble filo puesto que estas lesiones también pueden inducir resistencias, principal inconveniente de esta terapia junto con los efectos secundarios que provoca.^{2,4}

Terapia antihormonal

La terapia antihormonal intenta evitar el efecto promotor tumoral de ciertas hormonas como son los estrógenos o los andrógenos, que inducen la proliferación de las células tumorales. Un ejemplo de su aplicación sería para el tratamiento de algunos cánceres de mama en los que se están utilizando fármacos que actúan sobre el receptor de los estrógenos (ER), ya sean agonistas parciales tipo tamoxifeno, o antagonistas puros como el ICI 182.780 y el ICI 164.384. De momento con esta terapia sólo se han conseguido efectos transitorios, además de presentar numerosos inconvenientes como son la inducción de tumores de endometrio, osteoporosis, resistencias, etc.^{21,44}

Quimioterapia

La quimioterapia se basa en el empleo de agentes químicos citotóxicos de los que se espera que actúen de forma selectiva sobre las células cancerosas. Actualmente son aproximadamente 50 los fármacos que se están utilizando en quimioterapia, generalmente combinándolos con otras terapias para conseguir una mayor eficacia y disminuir el desarrollo de resistencias, al tiempo de

reducir las dosis de cada uno a los límites aconsejables de su toxicidad, empleando muchas veces terapias distintas de forma consecutiva.

Estos fármacos se clasifican en dos grupos: los que actúan a nivel de síntesis del ADN y los que lo hacen sobre componentes citoplasmáticos esenciales para la división celular; parece ser que la mayoría de los agentes citotóxicos causan lesiones en el ADN desencadenando la muerte celular por apoptosis. Las células que tienen mutados genes implicados en la inducción de la apoptosis suelen ser más resistentes a este tipo de tratamientos (ejem. *p53* y *bcl-2*).

La quimioterapia se puede aplicar como terapia primaria frente a determinados cánceres como son algunos linfomas, tumor de Wilms, carcinoma microcítico de pulmón, etc.; también se administra en pacientes en los que no es posible aplicar otra terapia por lo avanzado de la enfermedad y en combinación con la cirugía (vejiga, mama, laringe, algunos sarcomas).

Aunque para algunos cánceres se puede considerar que la respuesta es bastante favorable (testículo, linfomas, leucemias), existen otros muchos que no responden a estos tratamientos (melanoma, páncreas, etc.). La curación por quimioterapia se produce únicamente en un 15% de los tumores avanzados. De la clasificación de los cánceres humanos según su sensibilidad a la quimioterapia se deduce que en la mayoría de los cánceres más importantes, los avances son pequeños y en algunos casos prácticamente nulos. El principal problema al que se enfrenta al administrar tratamientos quimioterápicos es la aparición de resistencia, fenómeno que conduce a la pérdida de eficacia de dichos tratamientos e incluso en muchas ocasiones, las células llegan a desarrollar resistencia frente a múltiples fármacos; la falta de respuesta al tratamiento anticanceroso puede ser debida a las características intrínsecas del tumor (ya sea porque las células cancerosas no absorban o no metabolizen convenientemente al fármaco o lo degraden rápidamente, etc.), siendo más frecuente que ésta aparezca durante el transcurso del tratamiento.^{2,4}

2.5. Fármacos antineoplásicos.

La toxicidad de los fármacos antineoplásicos es debida a su falta de especificidad, un factor limitante para su empleo. Como se ha visto, la mayoría de estos fármacos actúan en fases específicas del ciclo celular, siendo activos preferentemente en aquellas células que estén en proceso de división. Estos fármacos son muy eficaces en tumores en los que existe un alto porcentaje de células en división, pero contrariamente son también diana los tejidos normales

con un alto índice de proliferación como es la médula ósea, los folículos pilosos o el epitelio intestinal. El conocimiento de la cinética del ciclo celular resulta hoy día esencial para el correcto uso de estos fármacos antineoplásicos.

En la mayoría de los casos los agentes químicos anticancerígenos no son específicos y en consecuencia, también dañan tejidos sanos. Esto ha estimulado la investigación de nuevos fármacos con nuevos mecanismos de acción y con potencial para superar la resistencia inherente.⁴⁵

2.5.1. Mecanismos de acción de fármacos antineoplásicos

Los fármacos quimioterapéuticos dañan las células cancerígenas por diversos mecanismos,^{2,45} esto debido a la variedad de blancos moleculares de éstos, por lo tanto las estructuras químicas son de lo más diversas. La clasificación de los fármacos quimioterapéuticos es en base al mecanismo de acción que presentan o bien de acuerdo al sitio de acción a donde van dirigidos.⁴⁶

a) Agentes alquilantes

Los fármacos alquilantes interfieren con la replicación del ADN.⁴⁶ El uso de las mostazas nitrogenadas marcó el inicio de la quimioterapia contra el cáncer.^{47,48} Estas reaccionan sobre los nucleófilos celulares y en el ADN principalmente sobre el átomo nitrógeno 7 de la guanina originando la formación de bases anómalas con timina, también es particularmente sensible a la formación de una unión covalente, tanto con agentes alquilantes monofuncionales como bifuncionales y puede muy bien representar el sitio blanco clave que determina los efectos biológicos de estos agentes. (Entre los efectos farmacológicos más importantes que presentan estos agentes son la alteración de mecanismos que intervienen en la proliferación celular, en particular, la síntesis de ADN y la división celular.) Aunque estos fármacos no actúan sobre una fase específica del ciclo celular, se observa mayor sensibilidad al final de la fase G1 y en la fase S.⁴⁸ Ejemplos de estos agentes alquilantes son mitomicina C, busulfan, entre otros (fig. 2).^{46,48,49}

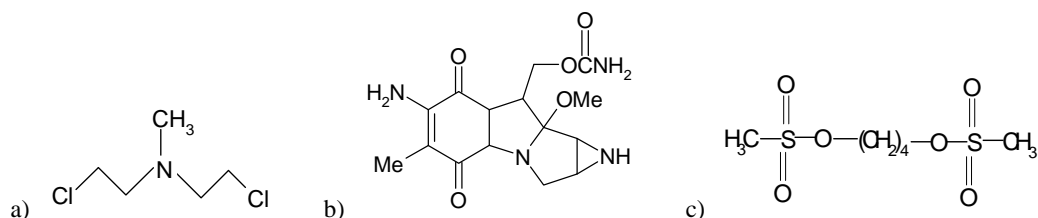


Fig.2. Estructuras de algunos agentes alquilantes. a)mecloroetamina, b)mitomicina y c)busulfan.⁴⁷

b) Agentes Hormonales

Útiles en el tratamiento de cáncer dependiente de hormonas como el de mama, próstata y cérvix. Este tipo de fármacos se unen al receptor de estrógenos (RE) promoviendo su migración hacia el núcleo, de esta forma se vuelve antagónica la acción de estos compuestos.^{25,48,50} Algunas veces se usan andrógenos para contrarrestar los efectos de los estrógenos y viceversa. Entre los fármacos de este tipo se encuentra el tamoxifen^{25,48,49,51} y acetato de ciproterona (fig. 3).⁵⁰ El tamoxifen es considerado como un modulador selectivo de receptor de estrógenos (SERMs) el cual se considera que puede actuar en el mismo sitio de unión al ligando, y se ubica en el dominio del receptor conocido como E/F localizado en la porción carboxilo terminal. Aun no se conoce como los SERMs, como el tamoxifen puede ser antiestrogénico en unas células y estrogénicos en otras, se cree que muchas de las actividades de los SERMs pueden ser explicadas a través de tres mecanismos: 1) diferente conformación del RE sobre el ligando 2) diferente expresión y unión al RE de proteínas correguladoras; y 3) diferente expresión del RE y activación del gen a través de no interactuar con elementos de respuesta a estrógenos (ERES).¹⁰³

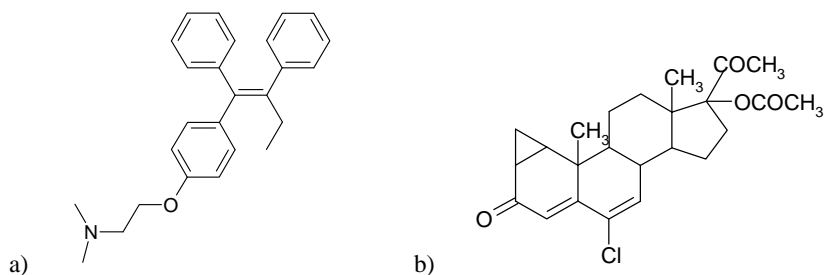


Fig. 3, Estructuras de agentes hormonales. a) Tamoxifeno y b) Acetato de ciproterona.⁴⁷

c) Antibióticos antitumorales:

Proviene de microorganismos del género *Streptomyces*, y se caracterizan por intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN de forma horizontal debido a su fuerza de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, esto causa la inhibición de la síntesis de ARN y ADN (las propiedades de un agente intercalador se verán más adelante) además de formar radicales libres de oxígeno que originan la ruptura de las cadenas de ADN. Ejemplos de estos fármacos son mitramicina, daunorrubicina y actinomicina D (fig. 4).⁴⁸

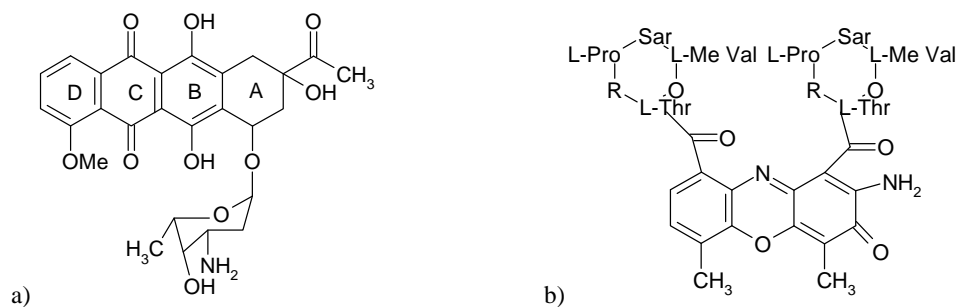


Fig. 4. Estructuras de algunos antibióticos antitumorales) daunorrubicina, b) actinomicina D⁴⁷

d) Antimetabolitos

Este tipo de fármacos intervienen con la replicación del ADN por medio de la inhibición de la síntesis de ADN.⁴⁶ Inhiben una vía metabólica esencial para la supervivencia o reproducción de las células cancerosas, a través del bloqueo de los mecanismos del folato, purina, pirimidina o nucleósidos de pirimidina, necesarios para la síntesis del ADN. No se ha descubierto ninguna vía metabólica exclusiva de las células cancerosas, pero los antimetabolitos pueden emplearse para matar a estas células, sin afectar a las del hospedador debido a las diferencias que presentan en su tasa de crecimiento.^{10,48} Algunos ejemplos son metotrexano, 6 tioguanina y citarabina.^{10,46,48}

e) Inhibidores de la mitosis.

Provocan una interrupción de la mitosis en la metafase⁴⁶ (como es el caso del compuesto colchicina) ya que interfieren con la formación del huso acromático, produciendo la detención de la metafase.^{48,52} Además interfieren con la síntesis del ARN de transferencia, probablemente

a través de una acción como agentes acilantes.^{10,48} Ejemplos de estos fármacos son la Vincristina y el Taxol.^{10,46,48,52,53,54}

Taxol

El taxol (paclitaxel) es el agente antineoplásico prometedor que ha sido introducido en el campo de la quimioterapia del cáncer en las tres últimas décadas.⁵⁵ Es un diterpenoide reportado por primera vez por Wall en 1971.^{56,57,58} Fue reconocido como un agente estabilizador de microtúbulos^{57,58} 10 años después por Horwitz y colegas. El compuesto llegó a ser de mayor importancia clínica en los noventas.⁵⁷ Actualmente es usado para el tratamiento de cáncer de seno y ovario entre otros (Fig. 5).^{57,59,60}

El paclitaxel es un inhibidor de la mitosis, y a diferencia de los alcaloides de la vinca causa la estabilización de los microtúbulos,^{61,62,63} esta estabilidad se da por la unión del paclitaxel a la unidad β del dímero de tubulina^{57,64} donde los aminoácidos β 1-31 y β 217-233 son importantes para la unión.⁶⁴ Como consecuencia de la estabilidad de los microtúbulos hay interferencia con los cambios dinámicos que ocurren durante la formación del uso mitótico, llevando al arresto mitótico y a la subsecuente inducción de la muerte celular.^{58,59,60}

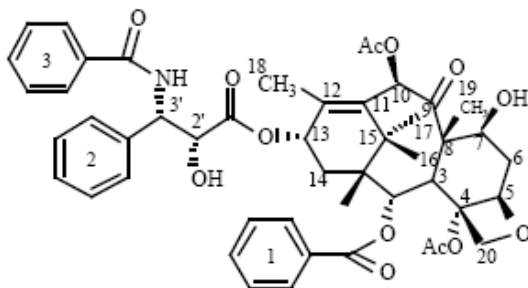


Fig. 5. Estructura química del paclitaxel. El paclitaxel consta de un anillo taxano como núcleo. Es una molécula poco soluble en agua y el primer estudio estructura actividad mostró que el núcleo taxano y la cadena C-13 son esenciales para su actividad.⁶⁵

f) Agentes intercalantes.

Son compuestos generalmente de estructura plana, aromáticos ó heteroaromáticos, capaces de incorporarse entre las pares de bases apareadas alterando la forma de la doble hélice, lo que impide la replicación y la transcripción y que al provocar un cambio en la conformación del ADN éste interfiere en la acción de las enzimas que se unen al mismo, generalmente

topoisomerasas tipo I y II.^{66,67} Este tipo de fármacos estabilizan la unión de un complejo de topoisomerasa I ó II con el ADN causando rupturas de una o las dos hebras dependiendo de la enzima que se trate.^{48,53}

La intercalación suele ser el primer paso de una serie de acontecimientos que terminan dañando al ADN por distintos mecanismos, fundamentalmente alterando las interacciones de éste con las enzimas mencionadas.⁶⁶

Los agentes intercalantes pueden interactuar con el ADN, aproximándose por el surco mayor o menor, pueden ser más o menos selectivos a determinadas secuencias de ADN. La formación de complejos por intercalación es reversible, siendo la fuerza impulsora para su unión una combinación de fuerzas electrostáticas, de Van der Waals e hidrófobas, así como enlaces de hidrógeno. Son cromóforos planos conjugados, deficientes de electrones que suelen llevar cadenas flexibles polares.^{67,68}

Entre los antitumorales intercalantes, están las antraciclinas. En ellas, el sistema de antraquinona es un cromóforo plano, particularmente bien adaptado para su intercalación entre los pares de bases del ADN, ya que su superficie se acopla íntimamente a la de éstas.

Los derivados de la acridina (fig. 6) se introdujeron en terapéutica en el siglo XIX como antipalúdicos y posteriormente se empezaron a usar la proflavina y la aminacrina como antibacterianos y más adelante algunos derivados de la 9-aminoacridina (como la amsacrina) se utilizaron como antitumorales. Las anilinoacridinas se intercalan con el ADN, situándose el anillo de la anilina casi perpendicular al plano del cromóforo acridina.^{67,68}

La intercalación es necesaria, pero no suficiente, para la acción antitumoral, ya que ésta se produce por la posterior interacción de un complejo del fármaco con la enzima topoisomerasa II. En consecuencia, y al igual que ocurre en el caso de las antraciclinas se produce ruptura de las hebras de ADN.⁶⁷

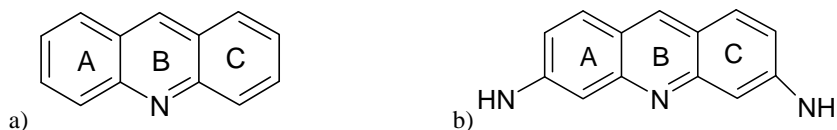


Fig. 6. Se muestra la estructura de acridina (a) y de la proflavina (b), uno de sus derivados.

2.6. Topoisomerasa II

Las ADNtopoisomerasas son enzimas nucleares esenciales para la supervivencia y proliferación celular en organismos procarióticos y eucarióticos,⁶⁶ catalizan la interconversión de diferentes formas topológicas del ADN.^{66,69} Estas enzimas son requeridas para la replicación, transcripción y recombinación.^{70,71,72} Todas las células contienen dos clases de topoisomerasas altamente conservadas y que se diferencian en base a sus propiedades físicas y mecánicas.⁷⁰

a) La topoisomerasa tipo I (Topo I) actúa cortando transitoriamente una de las dos cadenas de ADN,^{69,73} facilitando su rotación hasta que se emparejan ambas cadenas, luego se unen los extremos cortados y con esto queda eliminado un giro de la doble cadena de ADN.⁷⁴ Como inhibidores de la Topo I se encuentra la Camptotecina y sus derivados.^{73,48,66,67}

b) La topoisomerasa tipo II (Topo II) corta las dos hebras de ADN transitoriamente y es ATP-dependiente.^{68,70,75}

2.6.1. Mecanismo de acción de la topoisomerasa tipo II. Ciclo catalítico.

La actividad enzimática de las Topo II se puede describir brevemente en seis pasos:

1.- Unión al ADN. La Topo II se une a dos segmentos de ADN para iniciar el ciclo catalítico. La unión es dirigida por dos propiedades de la doble hélice que son: a) ciertas secuencias específicas de nucleótidos que son reconocidas por las topoisomerasas tipo II. b) La estructura topológica. Las Topo II, son capaces de distinguir la topología del ADN, distinguen regiones enrolladas y no enrolladas interactuando preferentemente con las regiones enrolladas.^{75,76}

2.-Formación del complejo previo a la translocación. Hay formación de complejo entre la enzima y el ADN en el que la enzima genera el rompimiento de la doble hebra de ADN en presencia de un ion divalente, estableciendo la formación de enlaces covalentes entre los residuos activos de tirosina y los nuevos grupos fosfato terminales 5'. La formación del complejo es reversible y la enzima establece un equilibrio entre la incisión y religación del ADN.^{75,76}

3.-Translocación. La Topo II experimenta un cambio conformacional que conduce el paso de una doble hebra de ADN, a través del corte transitorio formado en el paso anterior. En este paso

se incorpora ATP (dos moléculas), una molécula de ATP al hidrolizarse agiliza la translocación.⁷⁵

4.-Post-translocación. De nuevo se establece un equilibrio ruptura-unión de las hebras similar al del paso 2.

5.- Hidrólisis de ATP. La hidrólisis de la segunda molécula de ATP promueve la separación del complejo ADN-Enzima.

6.-Reclicaje de la enzima. Finalmente la enzima regresa a su conformación original y se prepara para comenzar de nuevo el ciclo catalítico (fig. 7).^{75,76}

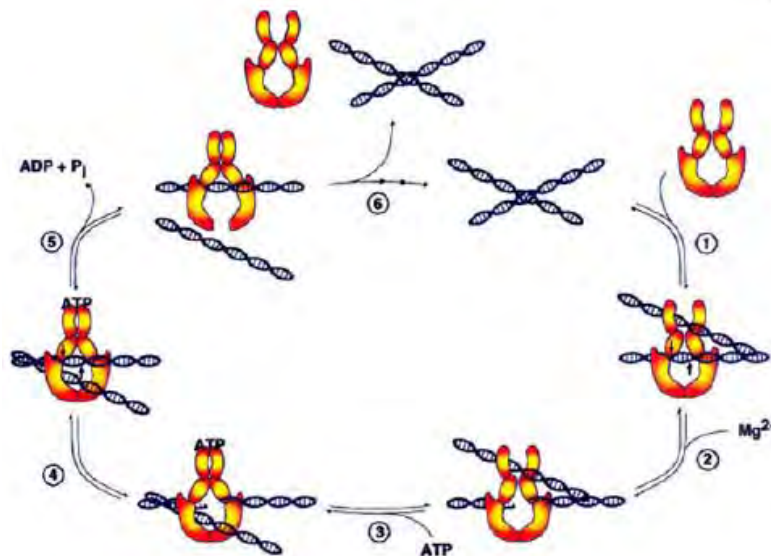


Fig. 7. Ciclo catalítico de la Topo II. El ciclo es mostrado en una serie de 6 pasos. 1) Unión ADN- Topo II ; 2) equilibrio ruptura-unión en la pretranslocación ; 3) Traslocación de ADN y unión de ATP al complejo ADN- Topo II; 4)Post-traslocación de ADN; 5)Hidrólisis de ATP; 6)Relajación del ADN y reciclaje de la enzima.^{75,76}

2.6.2. Topoisomerasa II como blanco en la quimioterapia.

La Topo II es el blanco principal de varias clases de fármacos antineoplásicos,^{66,68,69,70,73,76,77,78} estos agentes son exitosamente empleados en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer humano y su eficacia clínica se relaciona con la habilidad para estabilizar el complejo⁷⁷ anteriormente descrito en el paso 2 del ciclo catalítico (fig. 7). La incisión transitoria que efectúa la enzima en el ADN continúa sólo en presencia del fármaco, se propone que para que se efectúe el rompimiento de ADN se requiere la formación de un complejo ternario: enzima, ADN

y fármaco (inhibidor)^{68,70,71} mismo que puede originarse de tres formas como se muestra en la fig. 8.

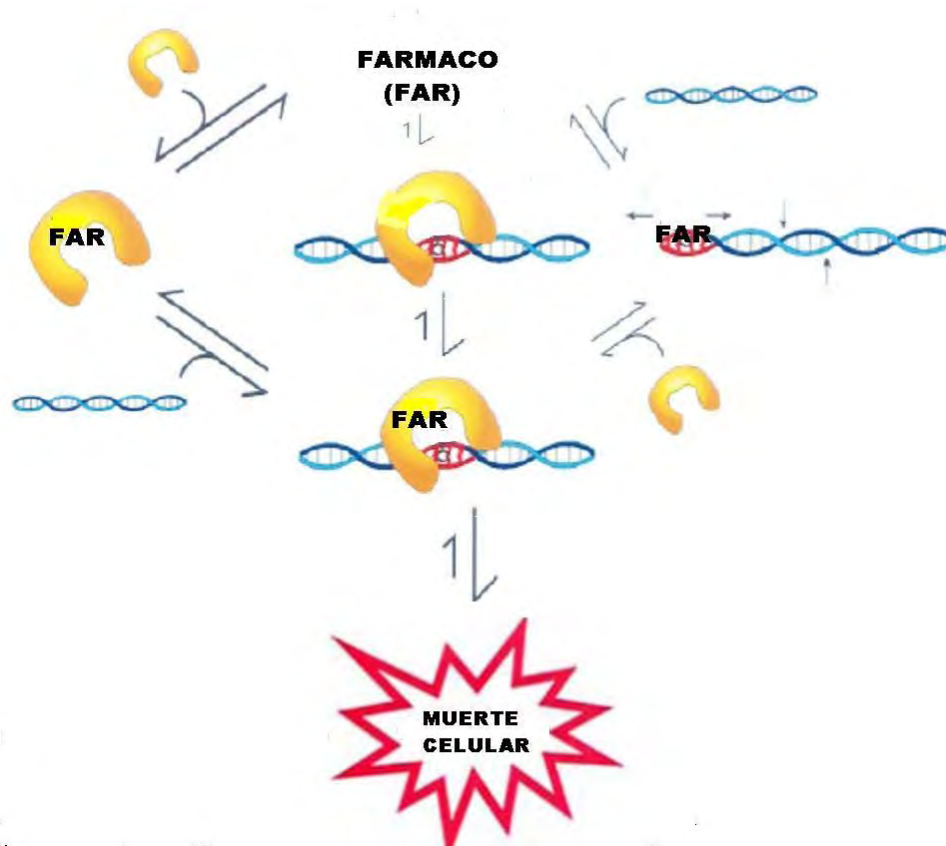


Figura 8. Formación del complejo ternario topoisomerasa-fármaco-ADN. El complejo ternario puede formarse por tres posibles rutas. El fármaco puede entrar a través de interacción con la topoisomerasa blanco (izquierda), DNA (derecha), o el complejo enzima- DNA (centro)^{70,78}

Los fármacos estabilizadores del complejo ADN-enzima (fig. 8), actúan uniéndose a dicho complejo el cual resulta tóxico y donde las hebras de ADN permanecen rotas lo que induce una serie de respuestas tales como:

*Activación de las rutas de reparación. Durante el proceso de reparación del ADN es posible que haya inserciones o deleciones de bases, las cuales pueden darse en genes vitales para el desarrollo celular.

*Alteraciones en el ciclo celular. En células que tienen copias funcionales de p53, el producto del gen supresor de tumores p53, se ha observado interrupción del ciclo celular en las fases G₁ y G₂, después del tratamiento de estabilizadores del complejo ADN-topo II. Sin embargo se ha demostrado que el etopósido y la doxorubicina son capaces de inducir apoptosis independientemente del status de p53, por lo que no está claro que tipo de mecanismo intervienen en la interrupción del ciclo celular.

*Activación de otras vías de señalización. El daño inducido puede activar otra serie de fenómenos como la elevación de la concentración de ceramidas lo cual puede conducir a apoptosis, activación de fosfatasa y cinasas, sin embargo aún no está claro el modo en que pudieran influir en la activación citotóxica.

Las respuestas anteriores pueden conducir al inicio de la muerte celular. Los aspectos morfológicos y bioquímicos de las células afectadas por este tipo de compuestos son similares a los observados en la muerte celular por apoptosis.⁷⁹

Entre los agentes quimioterapéuticos que inhiben a la topo II se encuentran las acridinas de las que se deriva el fármaco antitumoral amsacrina.^{25,67}

2.7. Compuestos derivados de Quinolinas. Tiazolo[5,4-b]quinolinas

El ADN es uno de los principales blancos para los fármacos anticancerígenos.^{80,81} El diseño y síntesis de moléculas cuyo blanco en particular son secuencias de ADN y el control de genes de expresión tienen considerable interés en la química, biología y medicina.⁸¹

Los derivados de la acridina y la quinolina han sido extensivamente estudiados como agentes antitumorales potenciales debido a su capacidad de intercalarse al ADN.⁵

La estructura planar de las acridinas confiere a las moléculas la habilidad de unirse fuertemente al ADN por intercalación.^{80,82} En el complejo de intercalación, los sustituyentes de acridina en las posiciones 4- y 9- son localizados en los surcos mayor o menor del ADN con el cromóforo de acridina incluido entre los pares de bases (fig. 9).^{83,84,85} La intercalación en hebras de ADN es una unión en donde el grupo de intercalación dirige sustituyentes en ambos surcos de manera simultánea^{80,83} diversos compuestos han mostrado unión a ADN por dicho mecanismo en los que se incluye las 9-anilinoacridina-4-carboxiamidas.^{83,87}

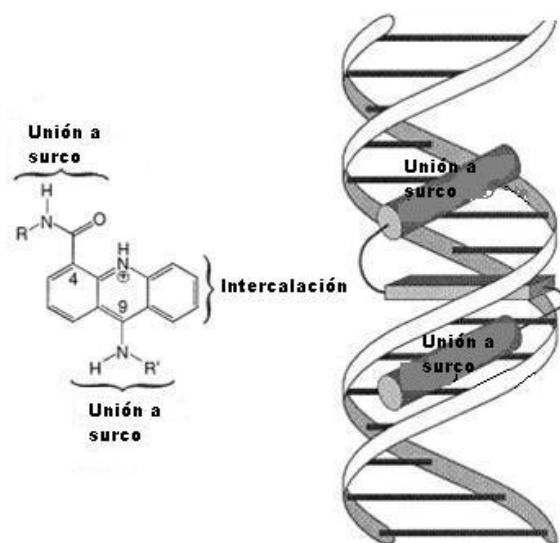


Fig 9. Estructura general de la acridina 4,9-disustituídas y esquema de su unión a ADN de doble cadena por intercalación.⁸³

Un gran número de alcaloides naturales y sintéticos derivados de acridinas han sido diseñados y probados como agentes anticancerígenos (fig. 10).^{78,80} Algunos de ellos como la amsacrina^{80,88} (un potente fármaco antileucémico conocido también como m-Amsa),^{6,88} 9-anilinoacridina^{78,80} y ledakrina y nitroacridina son usados en la clínica y varios derivados así como la 4-carboxamidoacridina DACA (XR5000),⁸⁰ imidazoacridinas⁸⁹ y pirazolo[3, 4, 5-k1]nitroacridina (PZA o NSC366140) son actualmente sometidas a pruebas clínicas.⁸⁰ La citotoxicidad observada en este tipo de compuestos puede estar relacionada con la inhibición de la actividad enzimática de la topoisomerasa II.^{80,88}

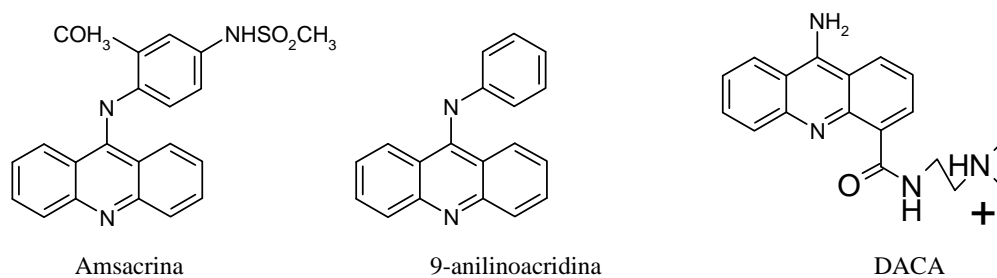


Fig. 10. Estructuras de algunos derivados de la acridina^{80,88}

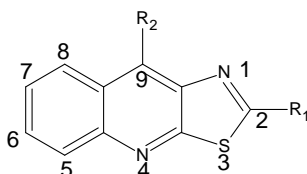
El mecanismo de acción de la acridina y derivados como la amsacrina consiste en su intercalación al ADN,^{69,90} que conlleva a la inhibición de la actividad de la topo II, que tiene lugar con la formación del complejo ternario topoisomerasa-fármaco-ADN^{69,76,78} anteriormente mencionado (fig. 8 y 9).

Por otra parte, la química de los derivados de quinolina ha recibido particular atención en los últimos años^{5,91} y una gran variedad de quinolinas ha sido sintetizadas^{5,92,93} y probadas como agentes antialérgicos, anti-inflamatorios, antifúngicos, antivirales⁵ antimalarías, antiaritmicos^{5,94} y antiprotozoarios.⁹² Entre todos estos derivados, las tiozolo[4,5-g]-, -[5,4-g]-, -[4,5-h]-, -[5,4-h]-, -[4,5-f]- y -[5,4-f]quinolina han mostrado alta actividad como agentes antibacteriales. Por otra parte la síntesis de derivados de tiozolo[5,4-b]quinolina raramente ha sido reportada en la literatura.⁵ Estos compuestos han sido descritos como agentes potenciales antiespasmódicos⁹⁵ y más tarde fueron evaluados como agentes antitumorales por Álvarez Ibarra, quien sintetizó nuevos compuestos derivados de tiozolo[5,4-b]quinolina, estos derivados están relacionados estructuralmente a las quinolonas y acridinas por sustitución isostérica del residuo bencénico por un anillo de tiazol (fig. 11).⁵



Fig.11. Comparación de estructuras de tiozolo[5,4-b]quinolina (a) y de acridina (b).⁵

Posteriormente Álvarez Ibarra realizó estudios in vitro de los compuestos sintetizados en líneas celulares tumorales (P388, A-549, Ht-29) para observar la citotoxicidad que estos nuevos compuestos presentaban. La actividad citotóxica obtenida fue buena,⁵ un átomo de flúor en la posición 7 y un grupo [(N,N-dietilamino)etil]amino (un grupo alquilamino) en la posición 2 o 9 de la estructura tricíclica planar heteroaromática mostraron ser importantes para la inducción de una actividad antitumoral significativa.⁵ A continuación se muestran algunos valores de IC₅₀ obtenidos en estos compuestos (Tabla1).

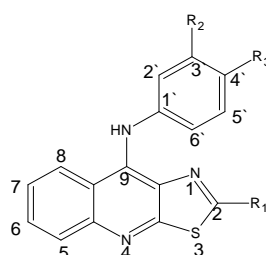


Compuesto	Sustituyentes			Línea celular		
	R1	R2	R3	P-388	A-549	HT-29
A	SMe	OH	H	>70.2	>70.2	>70.2
B	SMe	OH	F	>66.1	>66.1	>66.1
C	SO ₂ Me	OH	H	32.4±0.9	32.4±0.9	32.4±0.9
D	SO ₂ Me	OH	Me	>60.4	>60.4	>60.4
E	SO ₂ Me	OH	F	6.0±0.8	6.0±0.8	6.0±0.8
F	HN(CH ₂)NEt ₂	OH	H	5.76±0.07	7.22±0.02	7.22±0.02
G	HN(CH ₂)NEt ₂	OH	Me	3.3±0.3	5.6±0.2	3.3±0.2
H	HN(CH ₂)NEt ₂	OH	F	1.65±0.05	2.9±0.3	5.0±0.5
I	SMe	NH(CH ₂) ₃ NEt ₂	H	6.07±0.7	6.07±0.7	6.07±0.7
J	SMe	MeN(CH ₂) ₃ NMe ₂	H	12.1±0.9	12.1±0.9	12.1±0.9

Tabla 1. Se muestran valores de IC₅₀ μM obtenidos en algunos de los compuestos sintetizados por Álvarez Ibarra y col. entre los que se representa el valor más alto y el más bajo de IC₅₀ que se obtuvo. *NEt₂ = N(C₂H₅)₂, Me = CH₃

Posteriormente, Lira y col. sintetizaron una nueva generación de compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. La síntesis de los nuevos compuestos se basó en la metodología empleada por Álvarez Ibarra con algunas modificaciones con el propósito de obtener compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina con mejores propiedades citotóxicas.⁵ Los nuevos compuestos tienen un grupo anilino sustituido en la posición 9 de la estructura tricíclica. Realizaron estudios in vitro en líneas celulares (SW-480, SW-620, HeLa, Calo, C-33, MCF-7, CHO y K562) y los ensayos de citotoxicidad revelaron que el compuesto que además de tener el grupo anilino sustituido tenía un grupo [(N,N-dietilamino)etil]amino resultó ser el más citotóxico en todas las líneas celulares, lo cual apoyaba lo obtenido por Alvarez Ibarra.⁶ En el trabajo de Lira y col. también se llevaron a cabo estudios de intercalación por desplazamiento de bromuro de etidio en ADN por los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina. Para

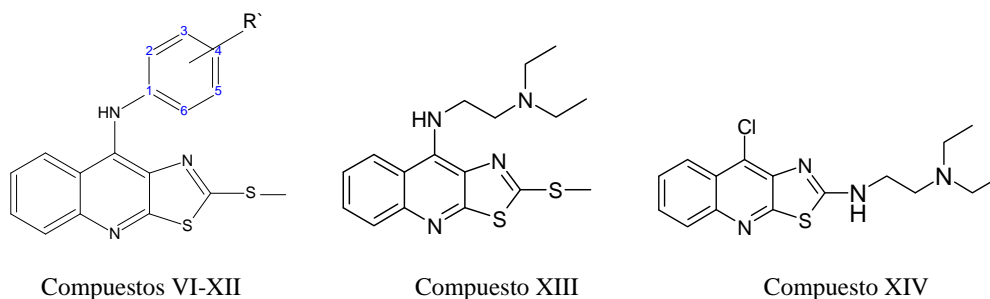
realizar dicho estudio se emplearon moléculas patrón como: (3-amino-5-hidroximetil)-9-anilinoacridina (AHMA) que se sabe tiene una aceptable actividad contra leucemia y es un buen intercalador de ADN; la 9-anilinoacridina que es biológicamente inactiva, sin embargo, posee gran capacidad como intercalador,⁶ En este trabajo se comprobó que la intercalación es un requisito para inducir la citotoxicidad pero no es un factor suficiente. Los datos obtenidos de IC₅₀ para los derivados de esta nueva generación de tiazolo[5,4-b]quinolina se muestran en la tabla 2.



Compuesto	Sustituyentes			Línea celular							
	R1	R2	R3	MCF-7	HeLa	CaLo	C-33	SW-480	SW-620	CHO	K-562
I	SCH ₃	H	H	>200	>200	198.3 ±15.8	153.7 ±7.7	>200	>200	>200	>200
II	EDA	H	H	16.6± 2.7	15.96 ±0.3	29.9± 1.5	22.4± 4.2	37.7± 0.8	21.6± 1.8	30.6± 11.1	16.8± 0.5
III	SCH ₃	NH ₂	H	74.3± 19.2	176.5 ±30.3	128.1 ±25.4	138.8 ±23.9	>200	>200	136.8 ±118. 2	143.4 ±11.5
IV	SCH ₃	NHAc	H	132.3± 28.5	>200	>200	>200	>200	153.9 ±28.6	58.8± 2.7	85.3± 10.2
V	SCH ₃	NH ₂	CH ₂ OH	138.5± 23.4	>200	106.4 ±2.1	>200	>200	183.9 ±69.9	111.4 ±6.5	143.4 ±6.9
m-Amsa	-	-	-	74.1± 1.2	9.5 ±0.6	18.3± 1.5	8.8± 0.5	27.7± 2.0	16.7± 2.8	9.3± 2.7	19.9± 0.8

Tabla 2. Se muestran valores de IC₅₀ μM obtenidos en algunos de los compuestos sintetizados de la primera generación reportados por Lira y col. m-Amsa se empleó como control positivo. EDA= HN(CH₂)₂N(Et)₂; NHAc = NHCH₂COOH.

Con los resultados observados en la primera generación, Lira y col. sintetizaron una segunda generación de compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina con el anillo anilino sustituido con diferentes grupos y conservando la cadena alquilamino (grupo [(N,N-dietilamino)etil]amino) en alguno de estos. Algunos valores de IC₅₀ se muestran en la tabla 3.⁷⁹



Compuesto	Sustituyente R`	Línea celular				
		HeLa	C-33	SW-480	SW-620	K-562
VI	3`-Cl	69.37±20.92	129.33±16.59	110.69±14.64	129.73±24.04	80.26±8.36
VII	3`-CN	7.75±1.13	15.08±10.36	28.68±16.88	43.75±15.47	8.01±0.65
VIII	3`-OMe	25.34±10.86	75.41±2.30	66.65±19093	26.58±1.60	22.17±11.33
IX	3`-CF ₃	43.34±11.80	59.73±3.46	65.13±5.29	62.28±1.60	67.06±22.08
X	3`-OH	>200	146.12±10.35	146.95±59.51	146.34±5.17	173.34±3.98
XI	4`-Cl	123.86±78.19	>200	>200	145.95±14.07	79.45±4.10
XII	4`-CN	140.02±51.82	>200	>200	>200	120.01±28.70
XIII	9- EDA	12.97±3083	9.06±1.86	27.97±9.22	16.87±2.19	7.85±1.85
XIV	2- EDA	12.86±2.34	9.35±1.96	19.48±9.81	15.22±2.34	9.28±0.65

Tabla 3. Datos de IC₅₀ μM obtenidos de algunos compuestos de la segunda generación de tiazolo[5,4-b]quinolina.
*EDA = NH(CH₂)₂N(ET)₂

2.7.1. Nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina

Recientemente y con el propósito de mejorar las propiedades citotóxicas de los compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina se ha sintetizado una tercera generación de dichos compuestos. Para llevar a cabo el presente proyecto de tesis se planteó la evaluación biológica de 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina:

- Compuesto 1; 9-anilino-2-(3-(dietilamino)propilamina)tiazolo[5,4-b]quinolina.
- Compuesto 2; (4-clorofenil)amino-2-(3-(dietilamino)propilamina)tiazolo[5,4-b]quinolina
- Compuesto 3; etil 3-{[2-(metiltio)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolina-9-yl]amino}benzoato
- Compuesto 4; 9-Cloro-2-(3-(dietilamino)propilamina) tiazolo(5,4-b)quinolina. Estos se muestran en la figura 12. ⁹⁶

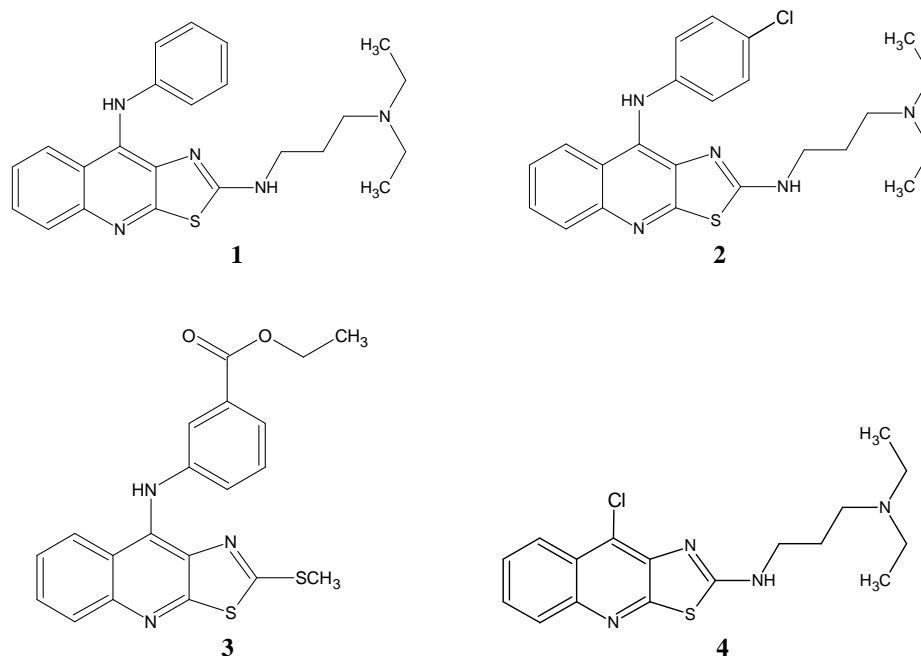


Figura 12. Estructura de los 4 nuevos derivados de tiazolo(5,4-b)quinolina.

El mecanismo por el cual estos nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina puedan intercalarse al ADN en ambos surcos de la cadena de manera simultánea sigue estando relacionado al de las moléculas patrón AHMA de las cuales se derivan estos compuestos: al igual que las 9-anilinoacridinas. Los nuevos derivados tiazolo[5,4-b]quinolina conservan el sistema tricíclico planar y/o un anillo anilino en la posición 9, en una orientación ortogonal que presentan las moléculas patrón, por lo que se proponen como potenciales intercaladores de ADN.

La evaluación biológica de los nuevos derivados tiazolo[5,4-b]quinolina esta basada en que la modificación con nuevos sustituyentes modificará las propiedades citotóxicas. Por otro lado se propondrá el tipo de muerte celular por la que estos compuestos inhibirían la proliferación en líneas celulares humanas.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar el efecto citotóxico de 4 nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en cultivos de líneas celulares humanas.

Objetivos particulares

- Evaluar la viabilidad celular en líneas celulares humanas tratadas con 4 nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina por ensayos de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).
- En base a los resultados de viabilidad celular determinar la IC_{50} de los 4 nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina.
- Caracterizar el tipo de muerte celular por el cual los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina inhiben la proliferación celular.

IV. HIPÓTESIS

Derivados previos de tiazolo[5,4-b]quinolina, que tienen como sustituyentes un anillo de anilina sustituido con grupos electroattractores y una cadena dietilendiamino en la posición 9 y 2 del anillo de tiazolo[5,4-b]quinolina respectivamente, presentaron actividad citotóxica, por lo que se espera que los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina que contienen por un lado al cloro en el anillo de anilina y por otro lado una cadena dietilpropilendiamina incrementarán la actividad citotóxica en líneas celulares humanas. Y al igual que en compuestos similares como amsacrina, estos nuevos compuestos podrán inducir muerte celular de tipo apoptótica.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Soluciones

Preparación de medio de cultivo

5.1.1. Medio Eagle modificado de Dubelcco (D-MEM) sin complementar (900 mL)

Medio D-MEM (Gibco)	un sobre de 10 g
L-Piruvato (Gibco)	10 mL
Antibiótico-antimicótico (Gibco)	10 mL
NaHCO ₃ (Sigma)	3.7 g
Aminoácidos no esenciales (Gibco)	10 mL
Ácido N(2-hidroxiethyl) piperazin N'-(2 etanosulfónico) (HEPES)(Sigma)	2.2 g
Agua desionizada estéril	c.b.p 900 mL

La preparación se realizó en una campana de flujo laminar utilizando material estéril.

1. En un vaso de presipitado (1L) se disolvió el sobre de medio de cultivo en 700 mL de agua desionizada junto con los otros complementos sólidos usando un agitador magnético.
2. Enseguida se adicionaron los constituyentes líquidos se agitó y se adicionó agua desionizada suficiente para completar 900 mL.
3. Se esterilizó el medio por filtración a través de membrana de nitrocelulosa (Millipore) de tamaño de poro de 0.22 µm.

Como control de esterilidad se colocó una alícuota del medio en una caja petri estéril y se incubó a 37° C por 48 h.

5.1.2. Medio D-MEM complementado.

Se siguió el mismo procedimiento que el anterior, se complementó con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Gibco). De igual modo se requirió de un control de esterilidad.

SFB	10 mL
D-MEM sin complementar	cbp 100 mL

Ambos se conservaron en frascos estériles bien cerrados y en refrigeración.

5.1.3. Medio de congelamiento

Para preparar 100 mL.

Medio de cultivo D-MEM sin complementar	80 mL
SFB (Gibco)	20 mL
Glicerol estéril (Merck)	17.5 mL

1. Todos los componentes se mezclaron en un matraz estéril hasta que la disolución se homogenizó y posteriormente en recipientes estériles se distribuyeron en viales de 15 mL y se conservaron en congelación a -20°C . Se descongeló al momento de utilizarse tomando sólo la cantidad necesaria.

5.1.4. PBS-EDTA (Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiamino)

NaCl (J.T. Bake)	8.0 g
KCl (J.T. Baker)	0.2 g
KH_2PO_4 (sigma)	0.24 g
EDTA sódico(sigma)	0.372 g
Na_2HPO_4 (sigma)	1.44 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

1. Las sales se disolvieron en 900 mL de agua destilada una a una, aforar a 1L con agua desionizada y homogeneizar la solución.
2. En caso necesario se ajustó el pH a 7.4 con NaOH o HCl diluido y al término de su preparación se esterilizó en autoclave.

5.1.5. PBS (Solución amortiguadora de fosfatos pH =7.4)

NaCl (J.T. Bake)	8.0 g
KCl (J.T. Baker)	0.2 g
KH_2PO_4 (sigma)	0.24 g
Na_2HPO_4 (sigma)	1.44 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

Se realizó de la misma manera que el PBS-EDTA.

5.1.6. Solución de MTT (2.5 mg /mL)

Para preparar 50 mL.

MTT (sigma)	125 mg
-------------	--------

PBS (estéril) 50 mL

1. Se pesó el MTT en un tubo Corning® (50 mL) estéril usando guantes y cubre bocas ya que es un compuesto tóxico.
2. Al tubo corning® se adicionó 25 mL de PBS par disolver el MTT y posteriormente se agregaron los mL restantes. Se cubrió el tubo con papel aluminio y se conservó en refrigeración.

5.1.7. Solución fijafora

Para preparar 50 mL.

Paraformaldeído 2 g

PBS c.b.p 50 mL

1. Se pesaron 2 g de Paraformaldeído, aparte, se virtieron 40 mL de PBS en vaso de precipitado y se calentó a 40°C en una parrilla.
2. Se agregó el Paraformaldeído al PBS, se agitó y conservó la temperatura hasta que éste se disolvió.
3. Se dejó a temperatura ambiente y enseguida se aforó a 50 mL.

La solución se guardó en refrigeración perfectamente sellada y rotulada hasta su uso. La solución preparada es óptima durante dos semanas o más.

5.1.8. TEN [10, 10, 0.15] (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0.15mM)

Para preparar 50 mL.

Tris HCl 10 mM, pH 7.5

EDTA(sigma) 10 mM, pH 8.0

NaCl 0.15 mM

1. Se pesaron 63.80 mg de Tris HCl, se disolvieron en 50 mL de agua destilada con ayuda de una barra magnética y con el potenciómetro se ajustó el pH a 7.5.
2. Se adicionó 186.12 mg de EDTA se esperó a que se disolviera, se procedió a ajustar el pH a 8.0. Por último se adicionó 483.3 mg de NaCl y disolveiron.

La solución se conservó en un frasco bien cerrado.

5.1.9. TEN [10, 10, 0.65] (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 0.65mM)

Para preparar 10 mL.

Tris HCl 10 mM, pH 7.5

EDTA (sigma) 10 mM, pH 8.0

NaCl 0.65 mM

1. Se pesaron 15.76 mg de Tris HCl, 377.224 mg de EDTA y 379.86 mg de NaCl por separado. Se procedió de la misma manera que para la solución anterior.

5.1.10. TE [1:1] (Tris HCl 1mM, pH 7.5 – EDTA 1mM)

Para preparar 100 mL.

1. Se pesaron 15.76 mg de Tris HCl y 37.22 mg de EDTA por separado. En un vaso de precipitado de 250 mL con magneto se vertieron 80 mL de agua destilada, se colocaron en una parrilla con agitador magnético. Se vertió el Tris HCl en el vaso de precipitado y agitó hasta que se disolvió, se ajustó el pH.
2. Se agregó el EDTA y disolvió.
3. La solución se guardó en un recipiente bien cerrado.

5.1.11. SDS 20% (dodecil-sulfato de sodio 20%)

Para preparar 50 mL.

Se pesó 10 g de dodecilsulfato de sodio y disolvió en 50 mL de agua destilada.

5.1.12. Sevag

Cloroformo – Alcohol Isoamílico, en proporción 24:1, V/V.

Para preparar 100 mL.

1. Se midió un volumen de 95.6 mL de cloroformo y un volumen de 4.4mL de alcohol Isoamílico por separado y se mezclaron.

La solución se guardó en un recipiente de vidrio perfectamente cerrado.

5.1.13. TBE (Tris base, ácido bórico- EDTA)

Tris base 10.8 g

Ácido bórico 5.5 g

EDTA (sigma) 0.74 g

Todos los componentes se pesaron por separado. En una parrilla con agitador magnético se colocó un vaso de precipitado de 1 L. Se midió un volumen de 1000 mL en una probeta y se adicionó al vaso de precipitado. Se incorporaron uno a uno los componentes conforme se disolvieron. Se ajustó el pH con un potenciómetro.

5.1.14. Bromuro de Etidio 10 mg/mL

Se debe manejar con sumo cuidado, es cancerígeno y se debe proteger de luz.

Para preparar 150 μ L.

1. Se pesaron cuidadosamente 1.5 mg de bromuro de etidio en un tubo ependof y se adicionaron 150 μ L de agua desionizada.

5.1.15. Amortiguador de carga (Loading Buffer)

Azul de bromofenol (Merck) 0.25%

Xilencianol (sigma) 0.25%

Glicerol (Merck) 30%

Se disolvió todo en agua destilada.

5.1.16. Gel de agarosa al 1.5%

Para preparar 100 mL.

1. Se pesaron 1.5 g de agarosa para 100mL de solución de TBE. Se calentó hasta disolver completamente los grumos de agarosa. Se dejó enfriar a 50° C aproximadamente y se añadieron 6 μ L de bromuro de etidio. Se homogenizó y se vertió en una placa de acrílico (limpia y seca) cuyo peine ya se había colocado a 1cm de la orilla superior y de tal modo que quedara un pequeño espacio entre la superficie de la placa y el peine.
2. Una vez solidificado se retiró el peine cuidadosamente.

5.1.17. Compuestos derivados de tiazoloquinolinas

Se pesaron las siguientes cantidades de los compuestos derivados de tiazoloquinolinas:

- Compuesto 1 2.2mg

- Compuesto2 2.2mg

- Compuesto 3 2.2mg

- Compuesto 4 2.0mg

1. Se disolvieron en 177.4, 183.056, 173.022, 159.622 μ L respectivamente de DMSO (Dimetil sulfóxido) y se obtuvo una concentración de 31395.35 μ M para cada uno con el fin de realizar las diluciones necesarias en medio de cultivo para obtener las concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 μ M en placas de cultivo de 96 pozos que se emplean en los ensayos de citotoxicidad.

2. Se mantuvieron en refrigeración.

Cada uno de los compuestos fueron amablemente proporcionados por el M en C Lira Rocha.

5.1.18. Características de las líneas celulares empleadas

- HeLa: Esta línea celular proviene del adenocarcinoma de cervix de una mujer de color de 31 años de edad. Crece de forma adherente y posee la secuencia para el virus del papiloma humano 18.⁹⁷
- Calo: Línea de cervix humano fue aislada de una paciente mexicana y posee la información del virus del papiloma humano 18.⁹⁷
- SW480: Esta línea celular proviene del adenocarcinoma colorrectal y fue aislada por A. Leibovitz. Es tumorigenica en ratones desnudos y produce el antígeno carcinoembrionario. Su morfología es epitelial.⁹⁷
- SW620: Esta línea celular fue aislada por A. Leibovitz y proviene de una metástasis de adenocarcinoma colorrectal que se encontraba en un nódulo linfático, es tumorigénica y expresa el antígeno carcinoembrionario.⁹⁷
- MCF-7: Células de adenocarcinoma de mama humano, presentan ciertas características diferenciales de las células epiteliales de mamífero, incluyendo su capacidad para procesar estradiol vía receptores de estrógenos citoplasmáticos. Proviene de una mujer caucásica de 69 años.⁹⁷
- K562: Células de leucemia mielogénica crónica humana, obtenida de la pleura de una mujer de 59 años en fase terminal.⁹⁷

5.2. Métodos

5.2.1. Mantenimiento celular

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Se utilizó material limpio y estéril en la manipulación de medio de cultivo y líneas celulares.

5.2.1.1. Descongelamiento celular

- 1.- Del medio de cultivo D-MEM, complementado y atemperado a 37°C, se colocaron 3.5 mL en una caja de petri de 5 mL previamente rotulada.
- 2.- Se sacó el criotubo del N₂ líquido que contenía las células con que se trabajaron y se descongeló el contenido con agua tibia o con la mano.
- 3.- El contenido del criotubo se agregó en la caja de petri distribuyendo el contenido celular con movimientos circulares suaves.
- 4.- Se incubó a 37°C, 5% de CO₂ y 99% de humedad por dos horas o hasta que las células se adhirieron a la superficie de la caja de petri y se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se incubó bajo las mismas condiciones.

5.2.1.2. Cuidado celular

Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas petri de plástico estériles, con medio de cultivo DME-M complementado el cual se cambió cada tercer día o según se requirió. El cambio del medio de cultivo se realizó de la forma siguiente.

- 1.- El medio que se encontraba en la caja petri se eliminó por decantación.
- 2.- Las células adheridas a la caja petri se lavaron con una solución de PBS-EDTA, cuantas veces se requirió, dependiendo de la cantidad de detritos observados al microscopio.
- 3.- Finalmente se adicionó medio fresco y las células se volvieron a incubar a 37°C, 5 % CO₂, 99% de humedad.

5.2.1.3. Propagación de líneas celulares

Cuando se presentaba una confluencia de 90% (cantidad de células que ocupan el 90% de la superficie de la placa) era necesario subcultivarlas en un número menor en otra caja de cultivo, a continuación se indica el procedimiento.

- 1.-En un cultivo celular con una confluencia entre el 80 o 90 %, el medio de cultivo se eliminó de la caja.
- 2.-Se lavó la superficie de células adheridas con PBS-EDTA.
- 3.-Se adicionó PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular y se incubó durante 10 minutos.
- 4.-Se desprendieron las células con una pipeta Pasteur vertiendo el PBS-EDTA sobre la monocapa hasta desprenderla.
- 5.-Se disgregaron las células desprendidas succionando y expulsando suavemente el PBS-EDTA hasta que se observó por medio de un microscopio que se tenían en su mayoría células individuales.
- 6.- En una caja con medio de cultivo previamente atemperado a 37°C se adicionó una alícuota de la suspensión celular y se distribuyeron las células con movimientos circulares suaves y posteriormente se incubaron a 37°C, 5 % CO₂, 99% de humedad.

5.2.1.4. Congelamiento celular (criopreservación de líneas celulares)

La línea celular que se requería congelar debía poseer una confluencia del 90% al 95%, se procedió como en la propagación celular hasta obtener la suspensión celular.

- 1.-En un tubo de centrifuga se colectó la suspensión celular y se centrifugo a 168 G durante 5 min.
- 2.-Obtenido el botón celular se decantó el PBS-EDTA y resuspendió con el medio de congelamiento suavemente. Se emplearon aproximadamente 4.5 mL de medio de congelamiento por cada caja de cultivo cosechada.
- 3.- Se distribuyó la suspensión en criotubos y congelaron en posición vertical a -70°C por 2-4 horas y finalmente se introdujeron los criotubos en nitrógeno líquido.

5.2.2. Conteo celular

Para el conteo celular se empleó una cámara de Newbauer con su cubreobjetos perfectamente limpios (con etanol al 70 %), secos y colocados sobre un a superficie horizontal. Se prosiguió de la siguiente manera:

1. Una vez obtenida la suspensión celular se tomó una alícuota previamente homogeneizada de la misma (aproximadamente 200 µL) y se coló en la cámara de Newbauer.

2. Se dejó reposar unos minutos para que las células sedimentaran (no más de 5 min. para evitar que la muestra se secase).
3. Con ayuda de un microscopio invertido en el cual se colocó la cámara de Neubauer se realizó el conteo de las células que se encuentran en los cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos bajo el criterio siguiente:
4. Se contaron las células que se encontraban en cada uno de los 16 cuadros que comprenden cada cuadrante, incluyendo aquellas que tocaban el margen superior y el margen izquierdo, es decir en forma de una “L” invertida, omitiendo las células que tocaban el margen inferior y derecho, esto con el fin de evitar que una misma célula se tomara en cuenta para dos cuadros o más.
5. La cantidad de células contadas en los 16 cuadros de cada cuadrante debía ser similar (coeficiente de variación < 0.02), denotando con ello homogeneidad en la suspensión. Si no era así, se repetía el conteo a partir de una nueva alícuota con previa resuspensión de células en la muestra.
6. La cámara de Neubauer posee ocho cuadrantes por lo que debían contarse el total de células presentes en cada uno de ellos y obtener el promedio de células por cuadrante. Una vez obtenido el promedio se aplicó la siguiente fórmula:
$$Células /mL = promedio[1 *10^4]$$
7. Obtenido el número de células por mL se calculó el volumen de suspensión adecuado para agregar en cada pozo y realizar el ensayo de citotoxicidad.

5.2.3. Determinación de la citotoxicidad de cada uno de los compuestos derivados de tiazoloquinolina utilizando la técnica de MTT.

El ensayo del MTT se utiliza como método para cuantificar colorímetricamente la viabilidad celular en estudios de la proliferación celular y citotoxicidad. Se basa en la característica que tienen las sales amarillas de tetrazolio, como el MTT, que al reducirse forman un derivado del formazán insoluble en medio acuoso de color azul intenso; esta reducción es producida por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, activa solamente en células vivas (fig. 13). Se mide la intensidad del color azul de la muestra en un espectrofotómetro.^{98,99,100}

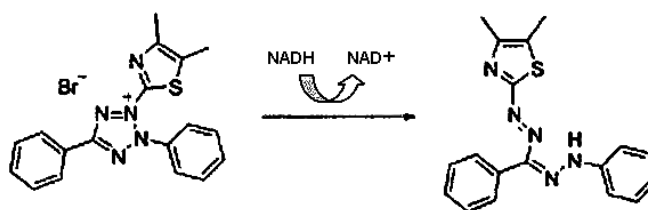


Fig. 13. Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo tetrazolio el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria.⁹⁸

El procedimiento fue siguiente:

5.2.3.1. Exposición al compuesto

En conjunto se evaluaron un control positivo y negativo así como control disolvente. Como control disolvente se utilizó DMSO en la misma cantidad que el compuesto, para el control solo se empleó el volumen equivalente en medio y finalmente como control positivo se empleó taxol a una concentración de 0.25 μM .

1. Partiendo de cultivos en confluencia del 80 al 90%, de cada una de las líneas, en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro, la superficie de las células se lavaron con 8 mL de PBS-EDTA (atemperado previamente a 30°C).
2. Se desprendieron las células con PBS-EDTA como se mencionó en la propagación celular.
3. Se homogenizó la suspensión celular y se contó en la cámara de Newbauer.
4. Se agregó de 5 a 6 $\times 10^3$ células por pozo en una placa con 96 pozos, agregando el volumen adecuado de medio de cultivo previamente atemperado a 37°C para completar 200 μL en cada pozo y se incubó por 24 h. Conforme transcurren las 24 h, el inóculo inicial de la población de células empieza a crecer en forma exponencial la cual es recomendable para que inicie la exposición de las células con el compuesto a probar, en este caso los derivados de tiazoloquinolinas, que se probaron a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 μM utilizando como disolvente DMSO (cantidad necesaria para obtener la concentración requerida).
5. Al término de la incubación se agregó el compuesto el cual se diluyó con medio de cultivo sin complementar o PBS de tal forma que se agregaran 50 μL por pozo para

completar 250 μL por pozo y se obtuvieron las concentraciones aproximadas, ya mencionadas, a las que se expusieron las células.

6. Se incubó a 37 °C, 5% de CO_2 en atmósfera húmeda durante 48 horas. Al término de la exposición del compuesto se midió la viabilidad celular por la técnica del MTT.

5.2.3.2. Técnica del MTT.

1. A cada pozo se adicionó 20 μL de solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL
2. Las células en contacto con la solución de MTT se incubaron por un mínimo de 4 h. Se observó un color rojo oscuro indicativo de que la reacción de reducción se había llevado a cabo.
3. El medio de cultivo de la placa se decantó mediante una inversión rápida, de esta forma se ha observado que se pierde menor cantidad de células que por aspirado.
4. Se extrajeron los cristales de formazán del MTT contenidos dentro de las células con 250 μL de DMSO pipeteando para lograr una disolución homogénea.
5. Las placas se leyeron en un lector de Elisa a 540 nm.

*El porcentaje de células muertas se calculó en relación al control solo y de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 * [1 - (\text{Absorbancia de células tratadas} / \text{Absorbancia de células control})]$$

*Determinación de IC_{50}

Se obtuvo el promedio del porcentaje de inhibición para cada concentración (5, 10, 20, 40 y 80 μM) el cual fue resultado de tres experimentos independientes cada uno realizado por sextuplicado. Posteriormente con los promedios del porcentaje de inhibición en función de la concentración, se realizó un análisis de regresión no lineal de tipo sigmoidal aplicando la ecuación de Boltzman por medio del programa OriginPro 7.0 (programa de cómputo) para obtener el valor de la IC_{50} para cada uno de los compuestos en las diferentes líneas celulares.

5.2.4. Fijación celular

1. Se estableció el crecimiento celular de la línea celular HeLa a una densidad de 7×10^5 en placa de 10 cm de diámetro en la que previamente se colocaron cubre objetos redondos para que las células proliferen sobre ellos.
2. Se incubaron por 24 h bajo las condiciones ya mencionadas y posteriormente se adicionó la cantidad necesaria de compuesto 2 a una concentración de IC_{50} .
3. Nuevamente se incubó a las mismas condiciones por 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h.
4. Al término de cada exposición se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS frío que también se retiró cuidadosamente y se agregó solución de Paraformaldehído al 4% que se dejó por 60 min. a temperatura ambiente.
5. El Paraformaldehído se retiró y se procedió a lavar con PBS frío, se retiró y se selló la caja con parafilm® y se conservó a una temperatura de 4 a 8 °C hasta su procesamiento.
6. Conjuntamente se fijaron células para control negativo, control disolvente y control positivo. Para el primero se empleó una caja sin tratamiento, para el segundo se utilizó un volumen de DMSO igual al volumen del compuesto empleado y para el último se empleó taxol cuya concentración final fue de 0.4 μ M, y su tiempo de exposición fue de 0 horas para los dos primeros y de 12 y 24 horas para los tres.

5.2.5. Tinción de Hematoxilina-eosina (H/E) para observar la morfología celular

Esta tinción se empleó con el objeto de observar el efecto en la morfología celular inducido por el compuesto 2 derivado de tizoloquinolina, la línea celular empleada fue HeLa. No fue necesario trabajar en la campana.

Se fijaron las células y se realizó la tinción con H/E con células HeLa tratadas con el compuesto 2 crecidas en cubreobjetos redondos. El procedimiento es el siguiente:

1. El cubreobjetos se lavó con PBS frío 2 veces, se dejó 5 min en cada lavada y se descartó.
2. El cubreobjetos se lavó con agua destilada, se dejó 5 min. Se retiró perfectamente el agua destilada y se procedió a teñir con Hematoxilina 4 min.
3. Luego de retirarla se enjuagó el cubre objetos con agua destilada varias ocasiones, misma que fue aspirada y se procedió a teñir con eosina por 3 min.
4. Se retiró y lavó con etanol absoluto 3 veces (rápidamente).
5. Se pasó por un tren de destilación de etanol a concentraciones de 70, 80, 96 y 100 %. El tiempo de exposición para cada concentración fue de dos minutos.

6. Se pasó primero por una solución de etanol-xilol 50% y 50%, después por xilol en varias ocasiones.
- 7.- Se dejó secar y se montó en resina y finalmente se procedió a observar al microscopio y a realizar tomas fotográficas.

5.2.6. Técnica de TUNEL

Para evaluar el efecto que tiene el compuesto 2 en la fragmentación de ADN de la línea celular HeLa, misma que se sugiere es causada por apoptosis se determinó el ensayo de TUNEL (siglas en inglés marcaje de extremos de DNA fragmentados con dUTP mediado por una enzima deoxinucleotidil transferasa terminal), se empleó el kit comercial In Situ Cell Death Detection. (Roche®) La técnica de TUNEL está basada en el marcaje de los extremos 3'OH libres generados durante la fragmentación del ADN en la muerte apoptótica, este fragmento terminal puede marcarse con ayuda de la desoxinucleotidil transferasa terminal (dUTP).^{Roche®,40,101}

El procedimiento es el siguiente:

1. Las células fijadas se lavaron a temperatura ambiente con PBS, después se permeabilizaron con solución de 0.1% de Tritón X100 en 0.1% de citrato de sodio por 2 min sobre una cama de hielo y se lavó con PBS.
2. Para el control negativo de la técnica se designó un cubre objetos con células a las cuales se trató con el buffer de reacción que marca al ADN fragmentado carente de la enzima deoxinucleotidil transferasa.
3. Para el control positivo de la técnica se expusieron células sin tratamiento con una solución 1 µg/mL de DNAsa (invitrogene) durante 10 min. a temperatura ambiente para inducir fragmentación y se lavó con PBS. Como control positivo de fragmentación inducido por un compuesto se utilizaron células tratadas con 0.25 µM de taxol.
4. Las células tratadas con el compuesto 2, taxol y con DNAsa se expusieron con la mezcla de reacción de TUNEL excepto las células negativas las cuales solo se expusieron con el amortiguador de reacción carente de la enzima deoxinucleotidil transferasa.
5. Se incubaron todas las células durante una hora a 37°C en cámara húmeda.
6. Posteriormente lo cubreobjetos con células se lavaron con PBS en dos ocasiones y se montaron sobre un portaobjetos con medio de montaje para microscopía de fluorescencia (Dako). Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia.

5.2.7. Fragmentación de ADN en geles de agarosa

Una de las características que se observa durante la apoptosis es la fragmentación de ADN en pequeños fragmentos que suelen ser múltiplos de 180 pb. El estudio cualitativo de este fenómeno se realiza al extraer el ADN de las células y observar el característico patrón del DNA fragmentado, en una electroforesis en gel de agarosa.^{40,101}

La electroforesis por medio de gel de agarosa o poliacrilamida es el método estándar empleado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La localización del ADN en el gel puede determinarse directamente por tinción con bajas concentraciones del intercalador fluorescente bromuro de etidio.¹⁰²

Con el objeto de continuar con la evaluación del efecto que tiene el compuesto 2 derivado de tiazolo[5,4-b]quinolina en la fragmentación de ADN de las líneas celulares, que como ya se mencionó se sugiere es por apoptosis, se realiza la técnica de escalera de ADN.

*Preparación de los cultivos celulares

1. Se requirieron cultivos de la línea celular HeLa con una densidad de 1×10^6 células en caja petri de 10 cm de diámetro de cada uno de ellos (se procedió como lo indica la técnica de propagación y de conteo celular).
2. Se incubaron 24 h y posteriormente se expusieron al compuesto, se adicionó la cantidad necesaria del compuesto para tener una concentración final igual a la IC_{50} obtenida a en el ensayo de MTT ($8.82 \mu M$). Nuevamente se incubó a las mismas condiciones por 0, 3, 6, 12, 24 y 48 h.

*Cosecha celular.

1. Al término de cada exposición se retiró el medio de cultivo de la caja de petri con una pipeta graduada estéril y se recolectó en un tubo corning® de 10 mL contenido en un baño de hielo.
2. La monocapa se lavó con 1 mL de PBS frío mismo que se recuperó en el tubo corning®.
3. Se agregaron 2 mL de PBS para despegar las células de la superficie de la caja.
4. Se incubaron a $37^\circ C$ por 10 min aproximadamente, hasta que se observó aparición de turbidez en el medio (lo cual demuestra el desprendimiento de las células).
5. Con una pipeta pasteur o graduada se tomó la suspensión celular y recolectó en el mismo tubo corning®.
6. Se enjuagó la caja petri con 1 mL de PBS frío y se adicionaron en el tubo corning®.
7. Se centrifugó 5 min. a 1509 G.

8. Se decantó y desechó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 0.5 mL de TEN 10,10, 0.15.
9. Se agregaron 5 μ L de solución de proteinasa K 10 mg/mL y 12.5 μ L de SDS al 20% posteriormente y se homogenizó la mezcla para después incubarse a 35°C por 4 h.
10. Se adicionaron 250 μ L de TEN 10,10, 0.65 y 1 mL de fenol saturado y se agitó hasta formar una sola fase y se centrifugó por 10 min a 358 G.
11. La fase acuosa se transfirió a otro ependorf. añadiéndole 1mL de Sevag y se agitó vigorosamente.
12. Nuevamente la fase acuosa se separó adicionándole 2 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló y dejó actuar toda la noche, posteriormente se centrifugó para precipitar el ADN.
13. El etanol se decantó y se evaporó a temperatura ambiente, con o sin vacío. Se resuspendió el ADN en la mínima cantidad de solución TE posible (aproximadamente de 10 a 20 μ l).
14. Se preparó el gel para electroforesis.

*Preparación de las muestras:

1. Las muestras de ADN obtenidas fueron mezcladas 1:1 con buffer de carga. Se centrifugó en microfuga a 358 G para asegurarse de tomar el volumen total de la mezcla.
2. Se utilizó un marcador de peso molecular de múltiplos de 100 pares de bases (pb), que se depositó en el primer pozo del gel como referencia. Se tomó el volumen total de cada muestra con micropipeta y se depositó en los pozos subsecuentes.
3. Una vez finalizada la carga de las muestras en los pozos del gel, se cerró la cámara, se conectaron los electrodos (debiendo las muestras recorrer el cuerpo del gel hacia el catodo) y la fuente de poder se ajustó a 80 volts. La corriente eléctrica se interrumpió cuando el colorante azul de bromofenol (azul oscuro) recorrió más de 2/3 del largo del gel, hasta 3 ó 4 cm de su borde inferior.
4. El gel se retiró de la cámara de electroforesis y se colocó en el transiluminador. Con las medidas de precaución apropiadas (goggles o lentes de vidrio y placas de acrílico) se encendió el aparato para revelar las bandas de DNA a 302 nm (UV-B) y se tomaron fotografías en una cámara instantánea (polaroid D534).

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación citotóxica por medio de la técnica del MTT

Para evaluar el efecto en las líneas celulares tratadas con los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas se llevaron a cabo ensayos de MTT. Los resultados porcentaje de inhibición de la proliferación celular se observan en las gráficas 1 y 2. Se realizaron las curvas de viabilidad celular en función de la concentración (5, 10, 20, 40, y 80 μ M), en las diferentes líneas celulares después de 48 h de exposición con cada uno de los cuatro compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina para determinar posteriormente la IC_{50} correspondiente.

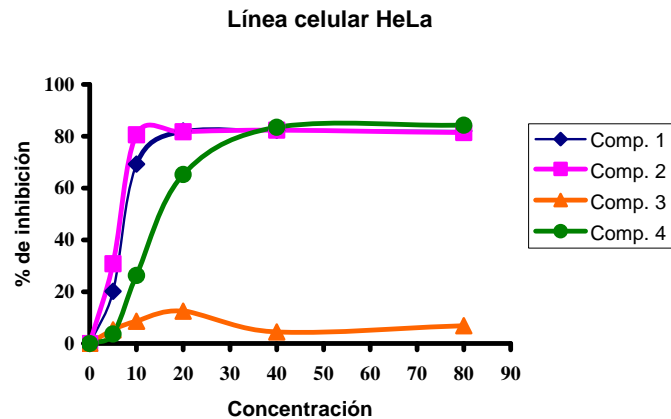
Las curvas de viabilidad celular revelan que el compuesto 1 presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares evaluadas a las diferentes concentraciones después de 48 h de exposición. La línea celular HeLa fue una de las más sensibles, seguida de las líneas SW480 y K562 (gráfica 1a, 1b, 1c).

El compuesto 2 resultó ser el más activo de los cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina prácticamente en todas las líneas celulares (gráfica 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c).

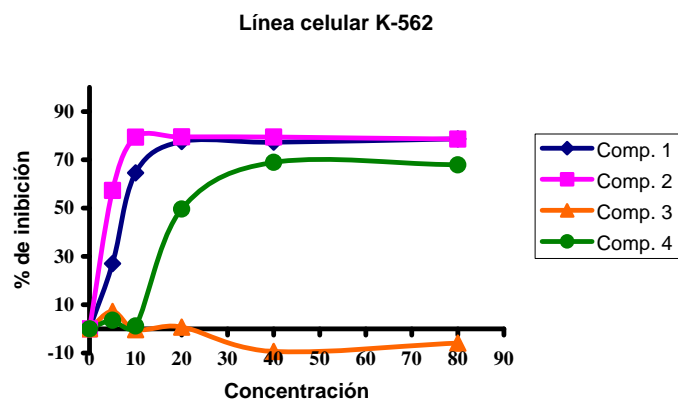
El compuesto cuatro mostró menor actividad en comparación con el compuesto 1, mientras que el compuesto 3 resultó prácticamente inactivo en las cuatro líneas celulares.

En general, los cuatro compuestos mostraron inhibición en la proliferación celular, a excepción del compuesto 3. Esta inhibición fue dependiente de la concentración en donde el compuesto más activo fue el 2 siguiéndolo en ese orden el compuesto 1, el compuesto 4 mientras que el compuesto 3 no tuvo actividad, este orden fue mantenido de forma constante prácticamente en todas las líneas celulares.

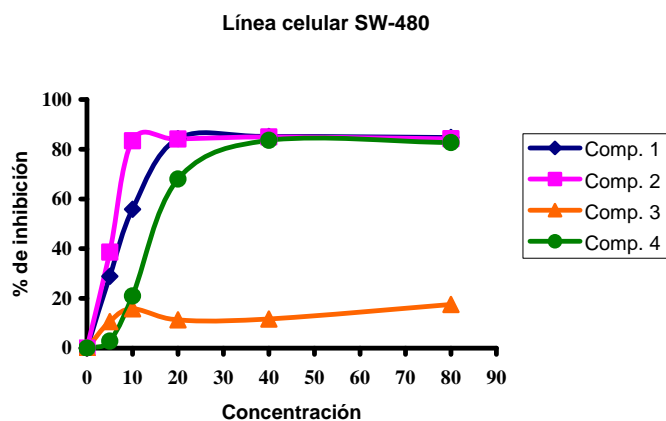
Inhibición de la proliferación celular por derivados tiazolo[5,4-b]quinolina en las líneas celulares HeLa, K562 y SW480



1a



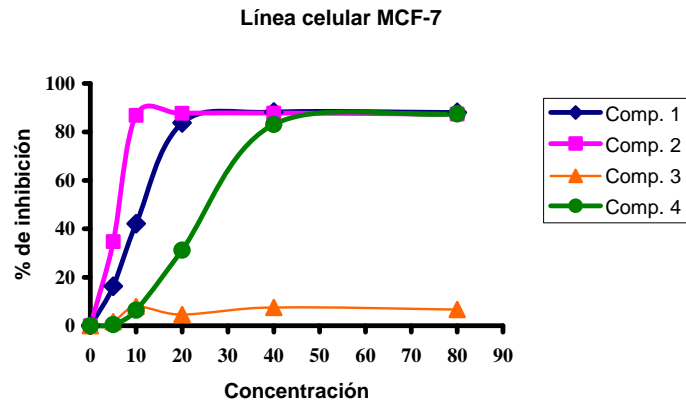
1b



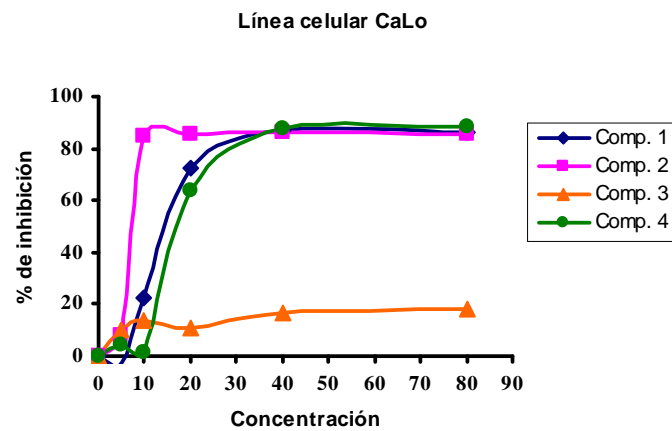
1c

Gráfica 1.-Porcentaje de inhibición de proliferación de las líneas celulares HeLa (1a), K-562 (1b) y SW-480 (1c), tratadas con los cuatro derivados tiazolo[5,4-b]quinolina a diferentes concentraciones (μM) durante 48 h. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por sextuplicado.

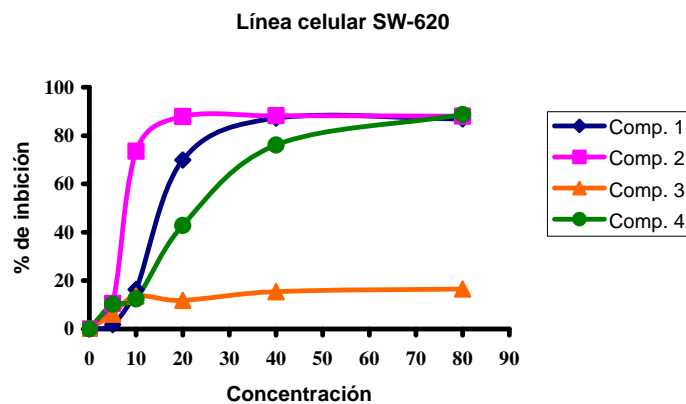
Inhibición de la proliferación celular por derivados tiazolo[5,4-b]quinolina en las líneas celulares MCF-7, CaLo y SW620



2a



2b



2c

Gráfica 2.-Porcentaje de inhibición de proliferación de las líneas celulares , MCF-7 (2a), CaLo (2b) y SW-620 (2c), tratadas con los cuatro derivados tiazolo[5,4-b]quinolina a diferentes concentraciones (μM) durante 48 h. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y cada uno llevado a cabo por sextuplicado.

Tomando los datos obtenidos de porcentaje de inhibición de cada uno de los cuatro compuestos en las diferentes líneas celulares se procedió a determinar los valores de las IC_{50} . Los valores de las IC_{50} se obtuvieron mediante un análisis de regresión no lineal de tipo sigmoïdal aplicando la ecuación de Boltzman por medio del programa OriginPro 7.0 (programa de cómputo). Los datos se ilustran en la tabla 4.

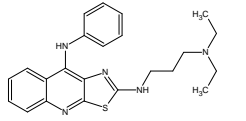
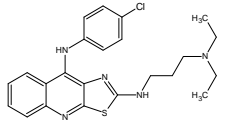
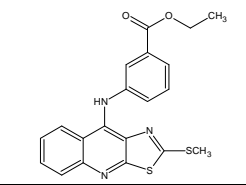
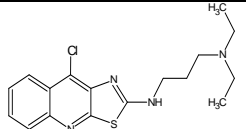
Compuesto	Líneas celulares	HELA	CaLo	SW-480	SW-620	MCF-7	K-562
	Estructuras						
1		6.27± 0.87	14.08± 4.36	6.90± 3.62	16.56± 3.17	11.17± 2.91	7.52± 1.91
2		8.82± 1.96	6.93± 1.79	4.92± 1.59	7.48± 1.95°	6.48± 2.6	3.36± 1.64
3		>80	>80	>80	>80	>80	>80
4		15.91± 1.87	15.23± 0.80	15.76± 2.73	24.4± 4.13	24.44± 1.38	17.52± 0.93

Tabla 4. Valores obtenidos de IC_{50} (μM) de los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en las diferentes líneas celulares humanas. En el compuestos 3 no se obtuvo la IC_{50} a la concentración máxima empleada que fue de 80 μM . Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm DS

De acuerdo a los resultados obtenidos el compuesto 1 presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares evaluadas a las diferentes concentraciones a 48 h de exposición. La línea celular HeLa es la más sensible con una IC_{50} de 6.27 μM , seguida de las líneas SW480 y K562 con una IC_{50} de 6.90 y 7.52 μM respectivamente.

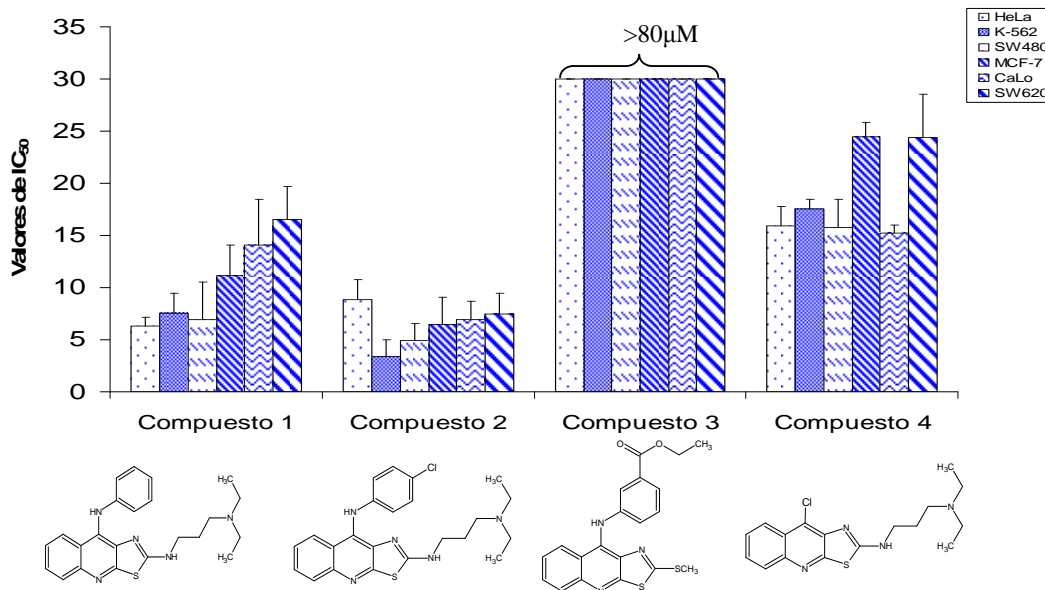
Como se mencionó anteriormente el compuesto 2 presentó la mayor actividad citotóxica en todas las líneas celulares, K562 resultó ser la más sensible con una IC_{50} de 3.36 μ M, siguiéndole la línea celular SW480 con una IC_{50} de 4.92 μ M.

El compuesto 4 presenta una actividad citotóxica en todas las líneas celulares relativamente menor al compuesto 1, para este compuesto las líneas celulares más sensibles fueron SW480 y HeLa cuyas $IC_{50(s)}$ son 15.76 y 15.91 μ M respectivamente, pero la línea celular más sensible fue Calo con una IC_{50} de 15.23 μ M. (tabla 4). Por otra parte el compuesto 3 evaluado en las diferentes líneas celulares no presentó una actividad citotóxica significativa, como se muestra en las gráficas 1 y 2 los valores de porcentaje de inhibición son menores del 13% por lo que no se puede determinar el valor de IC_{50} a las concentraciones utilizadas.

El conjunto de datos obtenidos de la evaluación de la actividad citotóxica muestra que la mayoría de los compuestos son muy potentes a bajas concentraciones como es el caso del compuesto 2 y 1 cuyo rango de valor de IC_{50} es de 3.36 a 8.82 μ M y de 6.27 a 16.56 μ M respectivamente, el compuesto 4 tiene valores que van de 15.23 hasta 24.44 μ M. Por otra parte el compuesto 3 no mostró actividad citotóxica independientemente de la concentración, esto ocurrió en todas las líneas celulares.

Los compuestos con mayor actividad citotóxica así como la estructura que presentan se pueden apreciar en la gráfica 3.

Comparación de IC₅₀ de los nuevos derivados tiazolo(5,4-b)quinolina en las diferentes líneas celulares



Gráfica 3. Valores graficados de IC₅₀ μM obtenido por medio el ensayo de MTT en cada línea celular para cada uno de los compuestos. En el compuesto 3 la IC₅₀ no se observó en las concentraciones empleadas.

Como se puede observar, el compuesto 2 que fue el más activo en las líneas celulares presenta un cloro en el anillo anilino a comparación con del compuesto 1 que no lo tiene y que resultó relativamente menor en actividad, siguiéndole el compuesto 4 el cual carece de todo el grupo anilino. Estos tres compuestos hacen evidente la importancia del grupo anilino y sus diferentes sustituyentes.

Los resultados muestran la importancia de los dos sustituyentes, tanto el grupo anilino con sus propios sustituyentes así como el grupo dietilpropilendiamina (grupo alquilamino), ya que el compuesto 2 que fue el más activo contiene un cloro en la posición 4' del grupo anilino a diferencia del compuesto 1 que es menos citotóxico y no tiene el cloro, mientras que el compuesto 4 carece totalmente del grupo anilino y resultó aún menos citotóxico. Los tres compuestos tiene en común la presencia del grupo alquilamino que le confiere gran parte de la actividad biológica, tanto el aporte del grupo anilino como el del grupo alquilamino queda evidenciado en el compuesto 3 que carece de ambos grupos y fue inactivo. Con todo lo anterior se puede sugerir que existe una relación estructura-actividad

6.2. Efecto en la morfología en células HeLa tratadas con el compuesto 2

En una aproximación por elucidar el tipo de muerte celular que inducen estos nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina se procedió a realizar una tinción de Hematoxilina-eosina en células HeLa tratadas por el compuesto 2, para observar los cambios en su morfología. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 14.

Como se puede observar, las células HeLa expuestas al compuesto 2 muestran cambios en su morfología desde las 3 horas como son condensación del núcleo, disminución del tamaño celular y finalmente desintegración. Además se observa una disminución en el número de células sugiriendo una aceleración en su muerte. De igual manera sucede con las células tratadas con el Taxol (utilizado como control de apoptosis), sin embargo, los cambios en estas células comienzan desde las 24 horas. Por otra parte el control disolvente no muestra alteración alguna sobre las células a los diferentes tiempos de incubación.

Las características presentadas tanto por el compuesto 2 como por el taxol son similares a los que se observan en la muerte celular por apoptosis.

Efecto en la morfología de los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en la línea celular HeLa

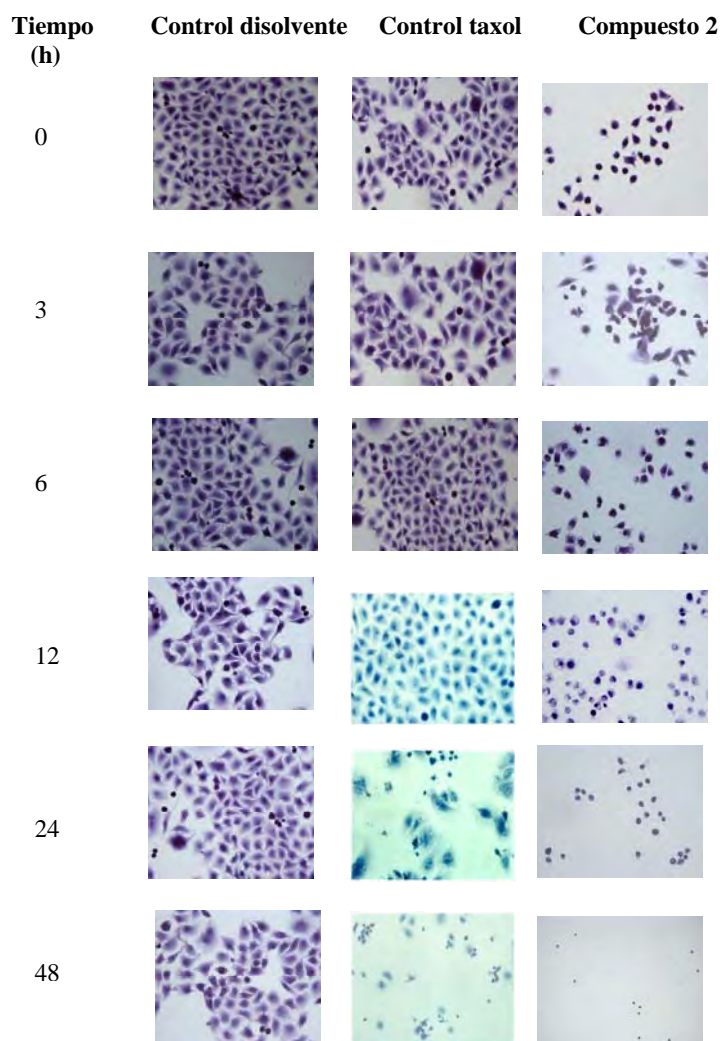


Figura 14. Tinción con Hematoxilina/Eosina en la línea celular HeLa tratada con el compuesto 2 (9 μ M), control disolvente (DMSO) y taxol (0.25 μ M). Observación a 40X.

6.3. Fragmentación de ADN por la Técnica de TUNEL

Como se mencionó anteriormente, la fragmentación del ADN es una prueba que sugiere que el tipo de muerte celular es por apoptosis.

Esta técnica se fundamenta en marcaje de extremos 3' libres originados por apoptosis. Este marcaje se realiza con la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína mediante una desoxinucleotidil transferasa.

Los resultados muestran que la línea celular HeLa tratada con el compuesto 2 presenta fragmentación desde las primeras 3 horas de exposición. Para el caso de las células expuestas al taxol la fragmentación se hace más notoria a partir de las 24 h. La fragmentación se manifestó en ambos casos por un marcaje fluorescente de color amarillo-verdoso intenso, en donde se puede apreciar la presencia de condensación de la cromatina nuclear. También se puede observar fragmentos celulares que posiblemente correspondan a cuerpos apoptóticos (figura 15).

Fragmentación de ADN inducido por el compuesto 2 en la línea celular HeLa

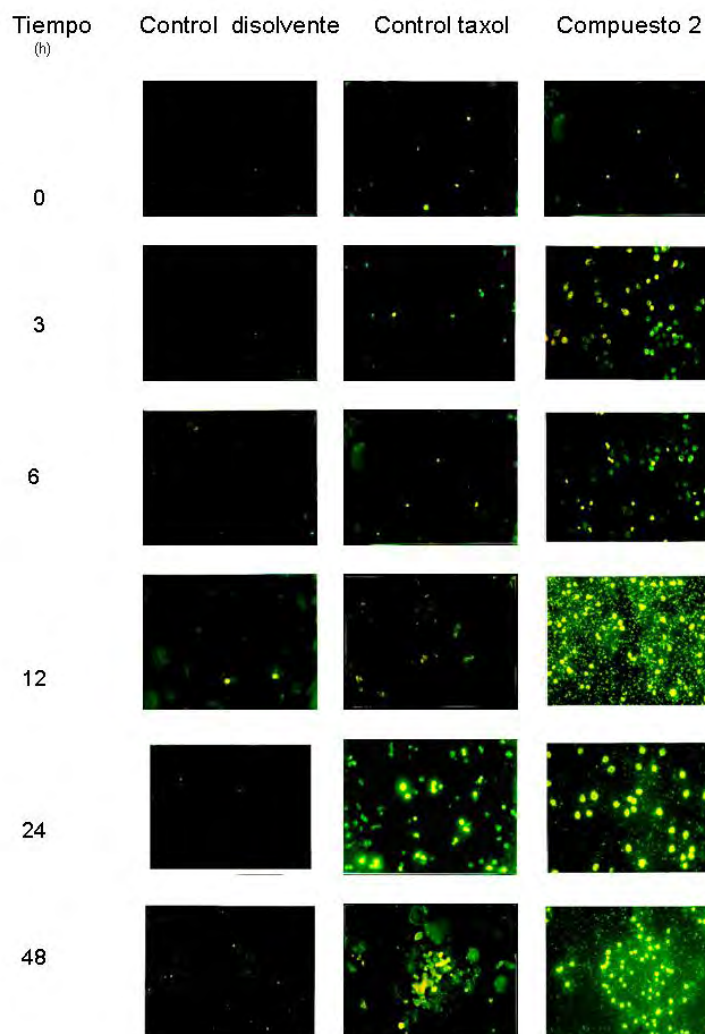


Fig. 15. Ensayo de TUNEL en la línea celular HeLa tratada con el compuesto 2 (9 μM), control disolvente (DMSO) y Taxol (0.25 μM). El marcaje verde fluorescente es considerado positivo de fragmentación de ADN. Aumento 20X.

6.4. Fragmentación de ADN por electroforesis en geles de agarosa

Para comprobar si la fragmentación de ADN en células tratadas con el compuesto 2 es resultado de un proceso apoptótico, se realizó la detección de la fragmentación de ADN utilizando electroforesis en geles de agarosa, técnica conocida como escalera por el patrón de bandas de ADN característico derivado de un proceso apoptótico. Los resultados demuestran que el compuesto 2 induce fragmentación de ADN, mostrando un patrón característico de escalera en la línea celular HeLa, dicho patrón se hace evidente a 24 horas de exposición al compuesto siendo más claro a 48 horas, mientras que el taxol utilizado como control positivo muestra una fragmentación difusa a 24 horas de exposición (figura 16). En base a este resultado se sugiere fuertemente que la inhibición de la proliferación celular por el compuesto 2 en células HeLa es producto de apoptosis.

Fragmentación de ADN en la línea celular HeLa

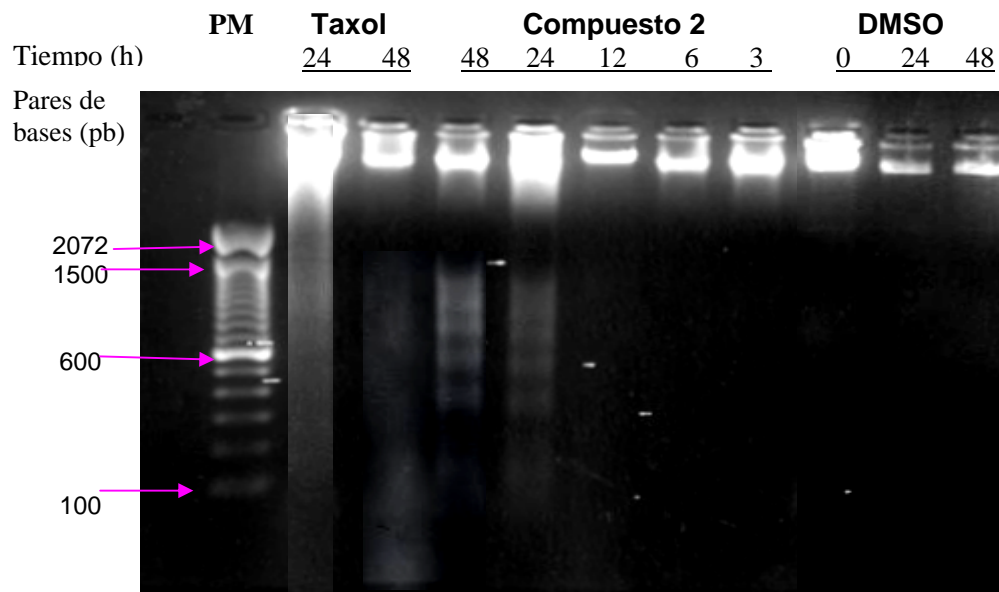


Fig. 16. Electroforesis mostrando la fragmentación de ADN en gel de agarosa, de células HeLa tratadas con el compuesto 2 (9 μ M), control disolvente (DMSO) y Taxol (0.25 μ M) a diferentes tiempos. Carril 1 marcador de pesos moleculares, carriles 2 y 3 taxol, carriles 4 - 8 compuesto 2 y carriles 9 al 11 control disolvente DMSO.

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la inhibición de la proliferación celular de 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina cuya acción ha sido evaluada mediante pruebas biológicas in vitro, utilizando líneas celulares de cáncer humano, los resultados se discuten a continuación.

Se obtuvo la cinética de inhibición en la proliferación celular de los 4 compuestos. De acuerdo a las IC_{50} obtenidas y a las diferencias estructurales de los 4 compuestos evaluados en este trabajo, se observa que los compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina que presentan en R2 la cadena dietilpropilendiamina (un grupo alquilamino) como sustituyente en el anillo de tiazolo, tal es caso de los compuestos 1, 2 y 4, presentan una actividad citotóxica más elevada al tener una IC_{50} más pequeña con respecto al compuesto 3 que no presenta esta cadena como sustituyente en el anillo tiazolo (tabla 5) y en base a los resultados obtenidos no muestra una actividad citotóxica relevante a las diferentes concentraciones en las líneas celulares

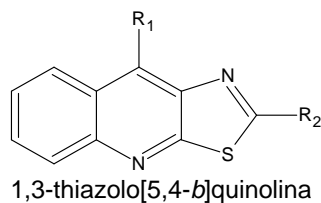
La presencia de la cadena dietilpropilendiamina como sustituyente en el anillo tiazolo, sugiere que es indispensable para generar una mayor actividad citotóxica en las líneas celulares. Lo anterior comprueba la importancia de este tipo de sustituyentes ya que en el trabajo de Álvarez Ibarra en el cual sintetizó los primeros compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en los que se encontraban compuestos que contenían también una cadena alquilamino (en este caso dietiletilendiamino), se muestra una mayor actividad citotóxica de estos compuestos con respecto a los que no la tienen⁵ (tabla 1, fig. 17). Posteriormente Lira Rocha y col. al sintetizar las dos primeras generaciones, de derivados tiazolo[5,4-b]quinolina en base a estudios moleculares señalaron lo mismo y lo comprobaron al realizar la actividad citotóxica.⁶

VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la inhibición de la proliferación celular de 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina cuya acción ha sido evaluada mediante pruebas biológicas in vitro, utilizando líneas celulares de cáncer humano, los resultados se discuten a continuación.

Se obtuvo la cinética de inhibición en la proliferación celular de los 4 compuestos. De acuerdo a las IC₅₀ obtenidas y a las diferencias estructurales de los 4 compuestos evaluados en este trabajo, se observa que los compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina que presentan en R2 la cadena dietilpropilendiamina como sustituyente en el anillo de tiazolo, tal es caso de los compuestos 1, 2 y 4, presentan una actividad citotóxica más elevada al tener una IC₅₀ más pequeña con respecto al compuesto 3 que no presenta esta cadena como sustituyente en el anillo tiazolo (tabla 5) y en base a los resultados obtenidos no muestra una actividad citotóxica relevante a las diferentes concentraciones en las líneas celulares

La presencia de la cadena dietilpropilendiamina como sustituyente en el anillo tiazolo, sugiere que es indispensable para generar una mayor actividad citotóxica en las líneas celulares. Lo anterior comprueba la importancia de este sustituyente ya que en el trabajo de Álvarez Ibarra en el cual sintetizó los primeros compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en los que se encontraban algunos compuestos con dicha cadena mostrando mayor actividad citotóxica de estos compuestos con respecto a los que no la tienen⁵ (tabla 1, fig. 17). Posteriormente Lira Rocha y col. al sintetizar las dos primeras generaciones, de derivados tiazolo[5,4-b]quinolina en base a estudios moleculares señalaron lo mismo y lo comprobaron al realizar la actividad citotóxica.⁶



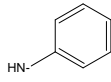
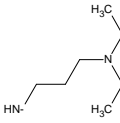
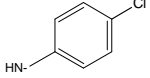
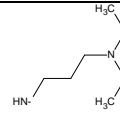
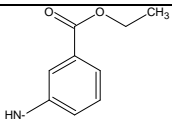
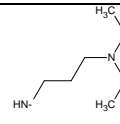
Sustituyente	R1	R2	HeLa	K-562	SW480
1			6.27±0.87	7.52±1.91	6.90±3.67
2			8.82±1.96	3.36±1.64	4.92±1.59
3		SCH ₃	>80	>80	>80
4	Cl		15.91±1.87	17.52±0.93	15.76±2.73

Tabla 5. Comparación de sustituyentes en los diferentes compuestos y la respuesta que generan en la citotoxicidad en la línea celular HeLa, K562 y SW480 (IC₅₀ μM).

Con el presente trabajo, al analizar el comportamiento de la tercera generación de tiazolo[5,4-*b*]quinolina a la que pertenecen los cuatro compuestos evaluados sobre la proliferación celular, se reafirma la importancia de la cadena alquilamino. Los compuestos que tienen esta cadena en cada caso presenta una IC₅₀ menor al resto de los demás compuestos. (tabla 1-4 y fig. 17).

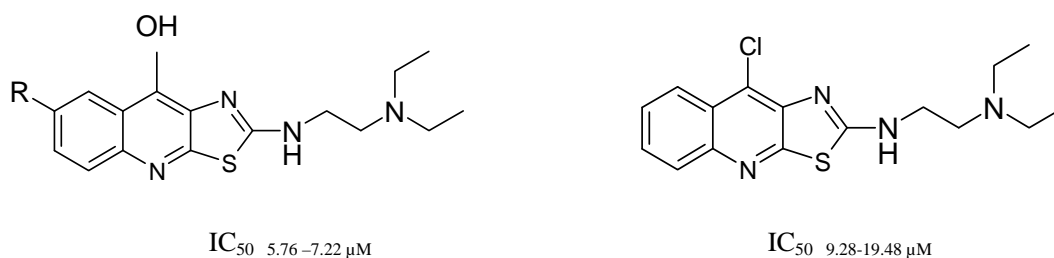


Fig. 17 Se presentan uno de los compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina con mayor actividad citotóxica obtenidos por Álvarez y Lira respectivamente, ambos compuestos coinciden en la cadena alquilamino.

Por otra parte, estructuralmente los compuestos que en R1 tienen un grupo fenilamino como sustituyente en el anillo B de tiazoloquinolina, además de la cadena alquilamino, muestran una propiedad citotóxica mayor sobre las líneas celulares, como son los compuestos 1 y 2, cuyas $IC_{50(s)}$ resultaron menores a la del compuesto 4. El compuesto 4 consta de un sustituyente cloro en lugar de un grupo fenilamino en el anillo B de tiazoloquinolina, el cual parece disminuir la actividad citotóxica del mismo (Tabla 5).

Otras diferencias estructurales entre los compuestos derivados de Tiazoloquinolinas que pueden influir en el incremento de la actividad citotóxica sobre las células tumorales radica en los grupos fenilamino que son sustituyentes en el anillo B de tiazoloquinolina. En el caso del compuesto 1, el grupo fenilamino tiene un sustituyente hidrógeno en el carbono 3, mientras que el compuesto 2 presenta un sustituyente cloro en el carbono 4 (tabla 5) y experimenta valores de IC_{50} menores a los que registra el compuesto 1 (tabla 4).

Estas diferencias en cuanto a su potencia y actividad citotóxica sugiere que la presencia de un grupo fenilamino sustituido por un cloro para el compuesto 2, incrementa aún más la actividad citotóxica que un grupo fenilamino sustituido por un hidrógeno en las líneas celulares evaluadas. Es decir los grupos electroattractores en el grupo fenilamina favorecen la actividad citotóxica, lo cual es apoyado por los trabajos del grupo del Dr. Lira Rocha.⁷⁹

En general se observó que los nuevos compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina que tienen una cadena dietilpropilendiamina en R2 resultaron tener más actividad citotóxica que el compuesto que no la presenta como es el compuesto 3. Sin embargo la actividad citotóxica se ve

incrementada en aquellos compuestos que además de la cadena dietilpropilendiamina presentan en R2 un grupo fenilamina sustituido por un cloro en el carbono 4.

Cabe mencionar que la línea menos sensible a los cuatro compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina fue SW620. La línea celular a la cual indujeron mayor inhibición en la proliferación celular fue variable, para el compuesto 1 fue HeLa con valores de IC_{50} que van desde 3.36 hasta 8.82 μ M y para el compuesto 2 fue K562 presentando valores de IC_{50} de 6.27 hasta 16.56 μ M.

Como se ha descrito previamente el mecanismo de acción por el cual inducen actividad citotóxica este tipo de compuestos, los cuales son estructuralmente parecidos a amsacrina, ha sido propuesto y en el cual se plantea la inhibición de la actividad catalítica de la enzima Topo II, que como consecuencia de su inhibición se induce la formación de complejos ternarios FÁRMACO-ADN-ENZIMA dicha formación de este tipo de complejos esta correlacionada con la inducción de muerte celular de tipo apoptótica.

Dentro de los objetivos de este trabajo fue conocer la posible inducción de las características de la muerte celular programada (apoptosis) la cual puede ser inducida por la acción de diferentes fármacos antineoplásicos como el taxol, compuesto usado en la clínica y que en el presente trabajo fue utilizado como control positivo de apoptosis.

Se emplearon dos diferentes técnicas para analizar el tipo de muerte celular el cual es inducido por el compuesto 2. Previamente se procedió a observar la morfología celular por medio de la tinción de H/E donde se mostró daño celular que en general fue similar al daño inducido por el taxol el cual se sabe induce apoptosis. En consideración a éste hecho se procedió a realizar la búsqueda de fragmentación de ADN mismas que claramente se observó al realizar la técnica de TUNEL. Finalmente se realizó la detección de fragmentación de ADN en geles de agarosa, donde se observa la clásica fragmentación del ADN característica de apoptosis con el compuesto 2. Con todo lo anterior podemos sugerir fuertemente que el tipo de muerte celular inducida por esta nueva generación de compuestos tiazolo[5,4-b]quinolina es apoptótico.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo puede concluirse lo siguiente:

De los cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina solo tres presentaron actividad citotóxica en las líneas celulares ratificando una relación estructura actividad.

El compuesto con mayor actividad citotóxica es el compuesto 2 con una IC_{50} calculada de 3.36 μ M en la línea celular K562.

De acuerdo a las diferencias estructurales y a las $IC_{50(s)}$ de los compuestos, la cadena dietilpropilendiamina como sustituyente en el anillo tiazolo es indispensable para que los compuestos derivados de Tiazolo[5,4.b]quinolinas presenten actividad citotóxica. Adicionalmente la contribución de los sustituyentes en el grupo fenilamino sustituidos en el carbono 4 por grupos electroattractores como el cloro aumentan aún más la actividad citotóxica.

La fragmentación de ADN inducida por el compuesto 2 en la línea celular HeLa evidenciada tanto por la técnica de TUNEL así como por la presencia de fragmentos múltiples de ADN sugieren que el compuesto 2 induce muerte por apoptosis.

IX. PERSPECTIVAS

Evaluar la citotoxicidad en células de tejido normal humanas tales como fibroblastos o células mononucleares de sangre periférica.

Determinar el mecanismo por el cual los compuestos inducen apoptosis.

Una vez definido el mecanismo de acción realizar estudios preclínicos en animales de laboratorio.

Posteriormente realizar estudios preclínicos adicionales para encontrar sus efectos toxicológicos.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Korolkovas, A. y Burckhalter, J., Compendio Esencial de Química Farmacéutica, Reverté, pág. 679-691, México, D.F., 1979
2. Koda, M., Yee, Y., Kradjan, W. & Guglielmo, J., Applied therapeutics: The clinical use of drugs, 8^a ed, Lippincott Williams & Wilkins, pp 88.1-88.15, New York, 2005
3. INEGI. Estadísticas vitales. 2005. Base de datos y estadísticas demográficas. www.inegi.org.mx/estadisticasvital2005.html
4. Foye, W., Principios de química farmacéutica, 2^a ed, Reverté, pág 881-908, Barcelona- Bogotá, 1988
5. Álvarez C, Fernández R, Quiroga M, Carbonell A, Cárdenas F, Giralt E. Síntesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. J. Med. Chem. 40: 668-676 (1997)
6. Rodríguez P, Quintero A, Rodríguez R, Solano J, Lira A, Síntesis and evaluation of thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potencial antitumorals. Eur. J. Med. Chem. 39:5-10(2004)
7. De Vita, VT. Principles of chemotherapy. In De Vita, VT. Hellman, R., Cáncer. Principles & practice of oncology, J.B. Lippincott Company, pp 273-300, Philadelphia PA., 1992
8. Baléese M. Terapia Génica contra el cáncer. Investigación y Ciencia. 8: 58-64 (1997)
9. Dr Jorge Plat García. Anatomía Patológica y Citología Exfoliativa. EL Cáncer en México. <http://www.internet.uson.mx/webpers/platt/cancer.htm>.
10. Meyers, F. Jawetz, E. y Goldfien, A., Manual de farmacología clínica., 5^a. ed., El manual moderno, pág. 466-503, México, D.F.,1982
11. De Flora S, Ferguson L. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. Mutat Res. 591: 8–15 (2005)
12. Guizar, J. y Salamanca, F., Génética clínica, 2^a. ed, El Manual Moderno, pág 575-587, México, D.F., 1994
13. Solis, A. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos por un compuesto derivado de quinolinas. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, U.N.A.M (2001)
14. Sport B. Carcinogenesis and Cancer: Different perspectives on the same disease. Cancer Res. 51: 6215-6218 (1991)
15. Temin M. Evolution of Cancer as a mutation-driven process. Cancer Res. 48: 1697-1701 (1988)

16. Jaattela M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogen* 23: 2746-2756 (2004)
17. Peralta O, Bahena M, Díaz C, Madrid V. Relationship between cell cycle and cancer development: Therapeutical approaches. *Salud Pub. Mex.* 39:451-462 (1997)
18. Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:559–564 (2005)
19. Hail N. Mitochondria: A novel target for the Chemoprevention of cancer. *Apoptosis.* 10: 687-705 (2005)
20. Williams G. Mechanims of carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 166: 3-10 (2001)
21. Montaner, B. Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral. Tesis para obtener el grado de Doctora en Farmacia. Universidad de Barcelona (2000)
22. Horak E, Steeg P. Metastasis gets site specific. *Cancer Cell.* 8: 93-95 (2005)
23. Velasco M, Agramonte J, Barrera D, Jiménez A, García M, Mendoza N, Landa M. 4-Hdroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matriz proteins and motility. *Cancer Lett.* 198: 179-186 (2003)
24. Okada H, Mac W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumuor cells. *Nature.*4: 592-602 (2004)
25. Katzung, G., *Farmacología básica y clínica*, 5ª ed, El Manual Moderno, pág 965-966, México, D.F., 1994
26. Lipsky, Ph. D. *Applied Toxicology. Carcinogenesis Section 6: Molecular Basis of Cancer NURS 735.* <http://aquaticpath.umd.edu/appliedtox/carcinogenesis6.pdf>
27. Klaassen, D. y Watkins III, J., *Manual de Toxicología*, 5ª ed, Mac Graw Hill Interamericana, pág. 169-215, México, D.F., 2001
28. Green S. Nuclear receptors and chemical carcinogenesis *Trends. Pharmacol. Sci.* 13: 251-255 (1992)
29. Thomas, R. *Drinking water and healt.* National Academic Press, pp 139- 166, Washington D.C. 1986

30. Goldstein, A. Aronow, L. Kalman, S., Principles of drug action :The basis of pharmacology, Jhon Wiley & sons, pp .667-727, New York, 1974
31. Okada M, Adachi S, Imai T. A novel mechanism for imatinib mesylate-induced cell death of BCR-ABL- positive human leukemic cells: caspase-independent, necrosis-like programmed cell death mediate by serine protease activity. *Blood*. 103: 2299-2307 (2004)
32. Jordán J. Apoptosis: Muerte celular programada. *OFFARM*.22:100-106 (2003)
33. Klaassen, C. & WatkinsIII, J., Manual de Toxicología, 5^a ed, Mac Graw Hill Interamericana, pág 36-74, México, D.F., 2001
34. Chamond R, Cariacedo A, Moreno C, Guerra F. Apoptosis y enfermedad. *Alergol. Inmunol. Clin*. 14: 367-374 (1999)
35. Fesus L, Peter J, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell Biol*. 56: 170-177 (1991)
36. Elinos C, Maldonado V, Meléndez J. Caspazas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta médica de Méx*. 139: 493-499 (2001)
37. Hengartner M. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 407: 770-776 (2000)
38. Bidère N, Senik A. Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview. *Apoptosis*. 6: 371-375 (2001)
39. Gruber B, Anuszevska E, Skierski JS. Activation of programmed cell death (apoptosis) by adramycin in human neoplastic cells. *Mutat. Res*. 484:87-93 (2001)
40. Sánchez L, Diosdado F. Apoptosis: The phenomenon and its determination. *Téc. Pec. Méx*. 41: 49-62 (2003)
41. Williams G. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell*. 65(7): 1097-1098 (1991)
42. Sánchez JA., López P, Recio M, Pérez M. Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors) induce apoptosis via Bcl-2 and caspase-3 proteins in neuronal cell cultures. *Toxicology Lett*.153: 311-326 (2004)
43. Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol. Cancer Ther*. 2: 573-580 (2003)
44. Oral cancer facts.<http://www.oralcancerfoundation.org/facts/index>
45. Papo N, Braunstein A, Eshhar Z, Shai Y. Supresion of Human Prostate Tumor Grow in Mice by a Cytolytic D-, L-Amino acid peptide: membrane lysis, increased necrosis, and inhibition of prostate-specific antigen secretion. *Cancer Res* 64: 5779-5786 (2004)

46. Nogrady, T. Medicinal Chemistry. A biochemical approach, 2nd ed., Oxford University Press, pp 407-423, New York, 1988
47. Avedaño, C. Introducción a la Química Farmacéutica. 2^a ed., McGraw-Hill/ Interamericana de España S.A.U, pág. 531-573, Madrid, 2001
48. Hardman, J.& Limbird, L. Goodman & Gilman's., The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed., McGraw-Hill, pp 1381-1445, New York, 2001
49. Bowman, W. Rand, M., Farmacología. bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas., 2^aed., Interamericana S.A. de C.V., pág 38.1- 38.20, México, D.F., 1984
50. Nogrady, T. Medicinal chemistry. a biochemical approach., Oxford University Press, 2nd ed. New York, pp 245-246, 1988
51. Kellen, John A. Tamoxifen. Beyond the antiestrogen. Birkhäuser Boston, pp 25-39, Toronto, 1996
52. Holland, J.& Frei, E., Cancer medicine, 5th ed., BC Becker, pp 93-139, Toronto, 2000
53. Holden J. DNA Topoisomerases as anticancer drug targets: From the laboratory to the clinic. Curr. Med. Chem.- 1: 1-25 (2001)
54. Grazia M, Chiarelotto G, Gasparotto V, Dalla L, Pezzi V, Barzon L, Palu G, Castagliuolo I. Síntesis and in vitro and in vivo antitumor activity of 2-Phenylpyrroloquinolin-4-ones. J. Med. Chem. 48: 3417-3427 (2005)
55. Dhanikula B, Panchagnula R. Preparation and characterization of water-soluble prodrug, liposomes and micelles of paclitaxel. Curr. Drug Del. 2: 75-91 (2005)
56. Ganesh T, Norris A, Sharma B, Alcaraz A, Snyder P, Kingston G. Design, synthesis, and bioactivity of simplified paclitaxel analogs based on the T-Taxol bioactive conformation. Bioorg. Med. Chem. 14(10): 3447-3454 (2006)
57. Johnson A, Alcaraz A, Snyder P. T-Taxol and the Electron Crystallographic Density in $\hat{\alpha}$ -Tubulin. Org. Lett. 7(25): 5549-5552 (2005)
58. Huisman C, Ferreira C, Broker L, Rodriguez J, Smit E, Postmus P, Kruyt F, Giaccone G. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H4601. Clin Cancer Res. 8: 596-606 (2002)
59. Pei L, Chien L. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. Life Sci. 76: 1623-1639 (2005)

60. Ofir R, Seidman R, Rabinski T, Krup M, Yavelsky V, Weinstein Y, Wolfson M. Taxol –induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent. *Cell Death Differ.* 9: 636-642 (2002)
61. Shiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by Taxol. *Nature.* 277: 665-667 (1979)
62. Lee E, Keutmann M, Dowling M, Harris E, Chan G, Kao G. Inactivation of the mitotic checkpoint as a determinant of the efficacy of microtubule-targeted drugs in killing human cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 3(6): 661-669 (2004)
63. Ring E, Ellis P. Taxanes in the treatment of early breast cancer. *Cancer Treat Rev* 31: 618–627 (2005)
64. Giannakakou P, Gussio R, Nogales E, Downing KH, Zaharevitz D, Bollbuck B, Poy G, Sacett D, Nicolaou KC, Fojo T. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: Molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(6): 2904-2909 (2000)
65. Suffnes, M. & Wall, M., Discovery and development of taxol in Taxol: Science and applications. Suffnes M., CRC Press, pp 1-25, Boca Raton Florida, 1995
66. Tabarrini O, Cecchetti V, Fravolini A, Nocentini G, Barzi A, Sabatini S, Miao H, Sissi C. Design and synthesis of modified quinolones as antitumoral acridones 1. *J. Med Chem* 42(12): 2136-2144 (1999)
67. Silverman, R., The organic Chemistry of drug design and drug action, Academic Press Inc, pp 220-241, San Diego-California, 1992
68. William, F. Cancer Chemotherapeutic Agents. American Chemical Society, pp. 205-261, Washington, DC, 1995
69. Grynberg N, Carvalho M, Velandia J, Oliveira M, Moreira I, Braz R, Echevarria A. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. *J. Med. Biol. Res.* 35(7): 819-822 (2002)
70. Froelich SJ, Osheroff N. Topoisomerase poisons: Harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J. Biol. Chem.* 270(37): 21429-21432 (1995)
71. Sappal DS, McClendon AK, Fleming JA, Thoroddsen V, Connolly K, Reimer C, Blackman RK, Bulawa CE, Osheroff N, Charlton P, Rudolph O, Laura A. Biological Characterization of MLN944: A potent DNA binding agent. *Mol. Cancer Ther.* 3(1): 47-58 (2004)

72. Chang JY, Hsieh HP, Pan WY, Liou JP, Bey SJ, Chen LT, Liu JF, Song JS. Dual inhibition of topoisomerase I and tubulin polymerization by BPR0Y007, a novel cytotoxic agent. *Biochem. Pharmacol.* 65: 2009-2019 (2003)
73. William, F., *Cancer Chemotherapeutic Agents.*, American Chemical Society, pp. 205-261, Washington, D.C., 1995
74. Acosta K, Zavala J. Proteínas de unión a DNA. *Rev Biomed.* 7:163-172 (1996)
75. Andoh T, Ishida R. Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta* 1400: 155-171 (1998)
76. Baldwin E, Osheroff N. Etoposide, Topoisomerase II and cancer. *Curr. Med. Chem.* 5: 363-372 (2005)
77. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Osheroff N. Effects of novel Fluoroquinolones on the catalytic activities of eucariotic topoisomerase II: influence of the C-8 fluorine group. *Antimicrob Agents Chemother.* 36(4): 751-756 (1992)
78. Burden D, Kingma P, Froelich AS, Bjornsti M, Patchan M, Thompson R, Osheroff N. Topoisomerase II-etoposide interaction directs the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* 271(46): 29238-29244 (1996)
79. Loza M, Marco A. Síntesis y análisis de relación estructura-actividad citotóxica de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. Tesis de maestría. UNAM, México, D.F., 2004
80. Charmantray F, Demeunynck M, Daniel C, Alain C, Lansiaux A, Bailly C, Coison P. 4-Hidroximetil-3-aminoacridine derivatives as a new family of anticancer agents. *J. Medical. Chem.* 46: 967-977 (2003)
81. Shangguan G, Xing F, Qu X, Mao J, Zhao D, Zhao X, Ren J. DNA binding specificity and cytotoxicity of novel antitumor agent Ge132 derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 2962-2965 (2005)
82. Murza A, Alvarez S, Sanchez S, Garcia J. Interaction of antitumoral 9-aminoacridine Ddrug with DNA and dextran sulfate studied by fluorescence and surface-enhanced raman spectroscopy. *Biopolymers* 72: 174-184 (2003)
83. Carlson CB, Beal PA. Solid-Phase sintesis of acridine-based threading intercalator peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 1979-1982 (2000)

84. Todd AK, Adams A, Thorpe JH, Deny WA, Walkelin PG. Major groove binding and 'DNA-induced' fit in the intercalation of a derivate of the mixed topoisomerase I/II poison N-(2-(Dimethylamino) ethyl) acridine-carboxiamide (DACA) into DNA; X-ray structure complexed to d(CG(5-BrU)ACG)₂ at 1.3-Å resolution. *J. Med. Chem.* 42: 536-540 (1999)
85. Adams A, Guss JM, Collyer CA, Deny WA, Walkelin PG. Crystal structure of the topoisomerase II poison 9-Amino-[N-(2dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboximide bound to the DNA hexanucleotide d(CGTACG)₂. *Biochemistry* 38: 9921-9933 (1999)
86. Liaw YC, Gao YG, Robinson H, van der Marel GA, van Boom JH, Wang HJ. Antitumor drug nogalamycin binds DNA in both grooves simultaneously: Molecular structure of nogalamycin-DNA complex. *Biochemistry.* 28: 9913-9918 (1989)
87. Wakelin PG, Chetcuti P, Deny WA. Kinetic and equilibrium binding studies of amsacrine-4-carboximides: A class of asymmetrical DNA intercalation agents which bind by threading through the DNA helix. *J. Med. Chem.* 33: 2039-2044 (1990)
88. Blasiak J, Gloc E, Drzewoski J, Wozniak K, Zadrozny M, Skórski T, Pertynski T. Free radical scavengers can differentially modulate the genotoxicity of amsacrine in normal and cancer cells. *Mutat. Res.* 535: 25-34 (2003)
89. Hyzy M, Bozko P, Konopa J, Skladanowski A. Antitumor imidazoacridone C-1311 induces cell death by mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 69: 801-809 (2005)
90. Rene B, Fosse P, Khelifa T, Jacquemin SA, Bailly C. The 1'-substituent on the anilino ring of the antitumor drug amsacrine is a critical element for topoisomerase II inhibition and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 49: 343-350 (1996)
91. Fournet A, Mahieux R, Fakhfakh MA, Franck X, Hocquemiller R, Figadere B. Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 891-894 (2003)
92. Vázquez MT, Romero M, Pujo MD. Synthesis of novel 2,3-dihydro-1,4-dioxino[2,3-g]quinolines derivatives as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 949-956(2004)
93. Suzuki T, Fukazawa N, San-nohe K. Structure-activity relationship of newly synthesized quinoline derivatives for reversal of multidrug resistance in cancer. *J. Med. Chem.* 40: 2047-2052 (1997)

94. Zhou Q, McCracken MA, Strob JS. Control of mammary tumor cell growth *in vitro* by novel cell differentiation and apoptosis agents. *Breast Cancer Res. Treat.* 75: 107–117 (2002)
95. Das B, Rout MK. Potential antiespasmotics. Quinolothiazoles. *J. Sci. Ind. Res.* 16: 125- 126 (1964)
96. Olvera, S. Síntesis de 2(-N',N'-alquil-N-trimetilenamina)-9-anilinothiazolo[5,4-b]quinilinas como potenciales antitumorales. Tesis para obtener el título de químico farmacéutico biólogo. UNAM, México, D.F., 2005
97. ATCC, Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7th ed., pp 4, 122, 123, 129, 130, 219, 220, 223, Rockville, Maryland, 1992
98. Lawrence N, Rennison D, McGown A, Ducki S, Gul L, Hadfield J, Khan N. Linked Parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J. Com. Chem.* 3:421-426 (2000)
99. Kumi J, Rodriguez R, Goudaze G. Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol. Cell.* 90: 349-354(1998)
100. Carmichael J, Mitchell JB, De Graff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, Glastein E, Minna JD. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer* 57: 540-547. (1985)
101. Gorezyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxinucleotidil transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53 : 1945-1951 (1993)
102. Sambrook, J. Fritsch, F. Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd. ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 6.3-6.49, New York, 1989
103. Lewis JS, Jordan VC Selective estrogen receptor modulators (SERMs): Mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mut. Res.* 30: 1-17 (2005)