



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE  
PIRIDO [2,3-*d*]PIRIMIDINAS Y  
 $\alpha$ -ALQUINILCETONAS SUSTITUIDAS CON  
GRUPOS ALQUILO, FENILO Y  
FERROCENILO, EN LÍNEAS CELULARES  
DE CÁNCER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

**P R E S E N T A:**  
EDITH MENDOZA TENORIO



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**      **Profesor:**   **Andrés Navarrete Castro**

**VOCAL:**              **Profesor:**   **Héctor García Ortega**

**SECRETARIO:**    **Profesora:** **Patricia García López**

**1er. SUPLENTE:**   **Profesora:** **María Eva González Trujano**

**2º SUPLENTE:**    **Profesora:** **Guillermina Yazmín Arellano Salazar**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA, SSA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**PATRICIA GARCÍA LÓPEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**NOÉ ROSAS ESPINOSA**

**SUSTENTANTE:**

**EDITH MENDOZA TENORIO**

*Gracias,*

*A esa energía llamada Dios,*

*A mis padres por el apoyo y amor incondicional a lo largo de mi vida,*

*Al latosito de David por la dicha de ser su hermana,*

*Por que sin ellos no sería lo que soy.*

*También gracias a mis amigos y amigas  
que me acompañaron estos últimos 5 años*

*Para quienes desean ser felices y exitosos:*

*éxito es tener lo que quieres,*

*pero felicidad es querer lo que tienes.*

Un especial agradecimiento:

A la Dra. Paty y a todo su equipo de trabajo y colaboradores del laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cancerología,

Al Dr. Noé y al grupo de trabajo del laboratorio de Inorgánica 1, en el Instituto de Química,

A la facultad de Química y a la UNAM,

Por haber aportado herramientas en mi formación como profesionista.

Este proyecto (número de registro IN-204507) fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT).

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. ANTECEDENTES</b>	
1.1 Cáncer	2
1.1.1 Bases moleculares del cáncer	2
1.1.2 Etiología del cáncer	3
1.1.3 Epidemiología del cáncer en México	4
1.1.4 Quimioterapia en oncología	5
1.2 Desarrollo de quimioterapéuticos antineoplásicos	7
1.3 Pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas	11
1.3.1 Métodos de obtención para pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas	11
1.3.2 Actividad biológica de las pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas	13
1.4 $\alpha$ -Alquinilcetonas	17
1.4.1 Síntesis de $\alpha$ -alquinilcetonas	17
1.4.2 Reacciones que involucran $\alpha$ -alquinilcetonas en síntesis de heterociclos	18
1.4.3 Actividad biológica relacionada con el ferroceno	18
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo General	21
2.2 Objetivos particulares	21
<b>3. HIPOTESIS</b>	21
<b>4. METODOLOGÍA</b>	
4.1 Proliferación celular	22
4.2 Sembrado de células	22
4.3 Evaluación del efecto citotóxico de piridopirimidinas y alquinilcetonas	22
4.4 Determinación del porcentaje de viabilidad celular.	24
4.5 Preparación de las soluciones stock	24
4.6 Evaluación estadística	25
4.7 Pruebas de solubilidad	25

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	26
5.1 Pruebas de solubilidad.	26
5.2 Determinación de la citotoxicidad de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas y $\alpha$ -alquinilcetonas por medio de la tinción con cristal violeta (CV)	28
5.3 Resultados de la evaluación citotóxica de pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidinas	30
5.4 Resultados de la evaluación citotóxica de $\alpha$ -alquinilcetonas	38
<b>6. CONCLUSIONES</b>	46
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	46
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	47

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un trastorno en el crecimiento y comportamiento celular, sus consecuencias deben definirse a niveles celulares y subcelulares. El estudio de los patrones de cáncer en las poblaciones puede contribuir sustancialmente al reconocimiento sobre los orígenes del cáncer. Es importante tener en cuenta los estudios que relacionan herencia e influencias culturales con la aparición de neoplasias malignas (Kumar, Abbas & Fausto, 2005).

Este padecimiento es una de las principales causas de muerte en el mundo, con el 12 % de las defunciones totales y el 70% de éstas muertes ocurren en países de ingresos bajos y medios, donde los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de cáncer son limitados o no existen (OMS, 2005).

Debido al aumento en la incidencia de neoplasias, en los últimos 20 años la quimioterapia en oncología médica ha incorporado fármacos que actúan desde la inhibición de síntesis de ADN, procesos proliferativos, inhibición de cinasas de moléculas blanco, hasta la estimulación del sistema inmune, con la finalidad de aumentar la actividad y disminuir su toxicidad (Hardman y col., 1993).

En el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos se plantean varias estrategias a seguir, como lo es la síntesis de análogos de fármacos con actividad conocida, aislamiento de compuestos de fuentes naturales y el diseño de nuevos fármacos dirigidos hacia un blanco terapéutico celular. Después de la síntesis se debe evaluar su toxicidad, eficacia y estrategia de dosificación. Siempre buscando que el tratamiento sea eficaz y seguro (Perry, 1992; Budman y col., 2003).

En la síntesis de fármacos antineoplásicos es importante simplificar los métodos de obtención de moléculas que presentan actividad biológica, como las pirido[2,3-*d*]pirimidinas, y evaluar su citotoxicidad cuando presentan sustituyentes diferentes a los reportados. Así como también es importante evaluar el posible efecto citotóxico de moléculas que se utilizan como materia prima en síntesis orgánica como es el caso de las  $\alpha$ -alquilcetonas. En el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica de pirido[2,3-*d*]pirimidinas obtenidas por medio de catálisis en medio acuoso; así como también se determinó la actividad de las  $\alpha$ -alquilcetonas utilizadas como sustrato para dicha síntesis.



## **1. ANTECEDENTES.**

### **1.1 Cáncer.**

Se le denomina cáncer a todos los tumores malignos, de ahí que la oncología se dedique al estudio de tumores o neoplasias. La palabra cáncer deriva del latín que significa "cangrejo" -quizá por que este padecimiento se adhiere a cualquier parte de una manera obstinada, como un cangrejo-. De acuerdo con Willis, un oncólogo británico, una neoplasia es: "una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales, persiste de la misma manera en exceso tras cesar el estímulo que suscitó el cambio" (Kumar, Abbas & Fausto, 2005).

#### **1.1.1 Bases moleculares del cáncer.**

El cáncer se considera como una enfermedad genética, ya que más del 1% de todos los genes humanos están involucrados con la generación y regulación del cáncer. Algunos principios fundamentales son:

- a) El daño genético no letal es el núcleo de la generación del cáncer. Tal daño o mutación puede ser espontáneo, estocástico o causado por factores ambientales.
- b) Un tumor está formado por la expansión clonal de una única célula precursora que ha sufrido el daño genético, por lo que un tumor se considera monoclonal.
- c) Las alteraciones genéticas se presentan en genes promotores del crecimiento (protooncogenes), genes supresores de tumores, genes que regulan la muerte programada (apoptosis) y genes involucrados en la reparación del ADN (Pelengaris & Khan, 2006).

Los genes relacionados con el cáncer influyen básicamente con siete cambios en la fisiología celular que determinan el fenotipo de una neoplasia:

- 1) Capacidad para proliferar independientemente de mitógenos exógenos. Por activación de un oncogén, las células pueden proliferar sin necesitar estímulos.
- 2) Resistencia a señales de inhibición para el crecimiento. Los tumores pueden no responder al factor de crecimiento- $\beta$  transformante (TGF-  $\beta$ ) y a inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas.

- 3) Resistencia a apoptosis. Puede inactivarse p53 para ser resistentes a la muerte celular programada.
- 4) Defectos en la reparación del ADN. Existe daño en el complejo enzimático encargado de la reparación del ADN, provocando la generación de mutaciones.
- 5) Gran potencial de proliferación sin restricción (inmortalidad). Es activada la telomerasa la cual se encarga del mantenimiento de la longitud y función del telómero.
- 6) Capacidad para la formación de nueva vascularización (angiogénesis). Se induce la formación de nuevos vasos sanguíneos por medio de la activación de factores como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
- 7) Capacidad para invadir otros tejidos y presentar metástasis. Las células adquieren la capacidad de transportarse por el torrente sanguíneo y proliferar en varios órganos (Kumar, Abbas & Fausto, 2005).

### **1.1.2 Etiología del cáncer.**

Los factores de riesgo que llegan a ser las causas del cáncer, involucran varios aspectos, como edad, predisposición genética, alimentación y/o por la exposición a agentes químicos, físicos o microbianos. Estos aspectos en conjunto determinan la susceptibilidad con que algunas poblaciones presentan un padecimiento específico. Como por ejemplo el caso de Japón, su tasa de mortalidad por cáncer de estómago es ocho veces mayor que en Estados Unidos. Sin embargo, los estadounidenses mueren en proporción dos veces más por cáncer de pulmón que los japoneses (Kumar, Abbas & Fausto, 2005).

La edad influye en la probabilidad de padecer cáncer, es la principal causa de muerte en mujeres de 40 a 79 años de edad y en hombres entre 60 y 79 años. La predisposición genética del cáncer puede desencadenar la aparición de síndromes heredados de forma autosómica dominante (por la mutación puntual en un alelo de un gen supresor tumoral) y autosómica recesiva (requiere la mutación de 2 alelos en genes involucrados en la reparación del ADN).

La exposición a diversos factores de riesgo pueden ser causantes directos de cáncer, lo cual dependerá del tiempo e intensidad de exposición. En el caso de virus

de ADN y ARN, que tienen la capacidad de integrar su genoma viral a la célula hospedera, finalmente provocaran la formación de un cáncer (tabla 1) (Kumar, Abbas & Fausto, 2005; Abeloff y col., 2005).

Alimentación	Agentes químicos	Agentes físicos	Agentes microbianos
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Grasa en exceso en la dieta.</li> <li>✓ Consumo de alcohol.</li> <li>✓ Alimentos procesados que contengan nitratos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Agentes alquilantes.</li> <li>✓ Hidrocarburos aromáticos policíclicos.</li> <li>✓ Aminas aromáticas.</li> <li>✓ Colorantes azoicos.</li> <li>✓ Agentes misceláneos (asbesto o cloruro de vinilo).</li> <li>✓ Metales (cromo o níquel) que se volatilicen.</li> <li>✓ Insecticidas organoclorados.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Radiación ultravioleta.</li> <li>✓ Radiaciones ionizantes (radiaciones electromagnéticas y radiaciones de partículas).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Virus del papiloma humano (VPH).</li> <li>✓ Virus de Epstein -Barr (VEB).</li> <li>✓ Virus de la hepatitis B (VHB).</li> <li>✓ Virus tipo 1 de la leucemia humana de células T (VLH-1).</li> </ul>

**Tabla 1. Factores de riesgo que aumentan la probabilidad de padecer algún tipo de cáncer.**

### 1.1.3 Epidemiología del cáncer en México.

En nuestro país los tumores malignos son la tercera causa de muerte, lo que representa el 12.9% del total de las defunciones. Desde hace 10 años ha aumentado la muerte por cáncer alrededor del 1%, tanto en hombres como en mujeres. En los varones, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año 2006 corresponden a los de: próstata (17.1%); tráquea, bronquios y pulmón (16.6%) y estómago (10.4 %). En las mujeres, 15.0% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al de mama y 13.9% más al del cuello del útero (cervico-uterino); asimismo el cáncer de colon, estomago y páncreas tienen un porcentaje similar en ambos sexos, el 5, 6 y 9 %, respectivamente. (INEGI, 2008).

Este trabajo se enfocó a la evaluación de nuevos compuestos sobre 3 líneas de cáncer: cervix (HeLa), mama (MCF-7) y colon (SW-480), las cuales representan los tipos de cáncer con mayor incidencia en nuestro país.

### 1.1.4 Quimioterapia en oncología

El objetivo de la terapia antineoplásica es eliminar completamente toda célula cancerosa, mediante métodos quirúrgicos, radioterapéuticos y farmacológicos. La farmacología antineoplásica constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad (Florez, 2003).

Se sabe que el metabolismo de una célula cancerosa es muy similar al de una célula normal, por ello se continúa con la búsqueda de fármacos que actúen de forma específica y que puedan diferenciar ambos tipos celulares. La diferencia más importante es que las células en un tumor (cancerosas) presentan una mayor tasa de crecimiento con respecto a otros tejidos.

En general, los quimioterapéuticos actúan sobre la síntesis de ADN o mecanismos que intervienen en la mitosis (división celular); una de las clasificaciones de acuerdo a la forma en que generan el daño sobre la molécula de ADN, se muestra en la tabla 2 (Perry, 1992).

Mecanismo de acción	Fármaco	Toxicidad
Por alquilación	Mostazas nitrogenadas (mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, ifosfamida, clorambucil)	Pancitopenia, toxicidad pulmonar, amenorrea, esterilidad, azoospermia, atrofia testicular, estado Addisoniano. La alopecia y toxicidad neurológica es rara.
	Nitrosoureas (carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, clorozotocina)	Mielosupresión severa, daño renal, náusea, vómito, hipofosfatemia, glicosuria, hipercloruremia, toxicidad pulmonar y síndromes mielodisplásicos.
	Otros (tiotepa, hexametilmelamina, busulfan, dacarbazina, mitomicina C, procarbazona)	Vómito, náuseas, cistitis, estomatitis, mucositis, exantema eritematoso, la toxicidad neurológica es poco común.
Por enlaces entrecruzados por coordinación con platino.	cis-platino, carboplatino	Nefrotoxicidad, daño gastrointestinal, neuropatías, mielosupresión, hipomagnesemia, infertilidad.
Por inserción en la doble cadena vía topoisomerasa II	Antibióticos (doxorubicina, daunorubicina, mitoxantrona, idarubicina, epirubicina, amsacrina)	Alopecia, náusea, vómito, diarrea, anorexia, fiebre, daño a médula ósea, estomatitis, necrosis por extravasación; daño pulmonar, renal, hepático y cardíaco.
	Podofilotoxinas (etoposido, tenoposido)	Mielosupresión, daño gastrointestinal, puede causar un choque anafiláctico, anorexia, diarrea, alopecia, hepatotoxicidad.

Por intercalación que bloquean síntesis de ARN	Dactinomicina, mitramicina	Necrosis por extravasación, trombocitopenia, hipocalcemia, estomatitis, daño renal y hepático, náuseas, vómito y diarrea.
Antimetabolitos (inhibidores de enzimas específicas)	Inhibidores de la timidilato sintetasa (5-fluorouracilo, 5-fluoro-2-deoxiuridina).	Daño mucosa intestinal y médula ósea, estomatitis, diarrea, alopecia, dermatitis, hiperpigmentación conjuntivitis y fibrosis, ataxia, somnolencia y toxicidad vascular.
	Dihidrolato reductasa (metotrexate).	Supresión de médula ósea, mucositis, diarrea, daño renal, disfunción hepática, neumonitis y neurotoxicidad.
	Polimerasa de ADN (citarabina)	Supresión de médula ósea, náusea, vómito, diarrea, estomatitis, elevación de las enzimas hepáticas y ataxia.
	Fosforibosilpirofosfato aminotransferasa (6-mercaptopurina, 6-tioguanina).	Mielosupresión, vómito, diarrea, náuseas, estomatitis.
	Adenosina deaminasa (pentostatina).	-----
Agentes antihormonales	Tamoxifeno, aminoglutatimida, leuprolida, flutamida.	-----
Agentes hormonales	Estrógenos, andrógenos, progestinas corticoesteroides.	-----
Modificadores de la respuesta biológica	Interleucina, BCG (Bacillus Calmette Guerin), levamisol.	-----

**Tabla 2. Clasificación de los fármacos antineoplásicos de acuerdo a su mecanismo de acción.**

## 1.2 Desarrollo de quimioterapéuticos antineoplásicos.

El desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos es el proceso por el cual se descubren nuevas moléculas con actividad antineoplásica y son evaluadas para conocer su eficacia y toxicidad.

El proceso de desarrollo de un fármaco antineoplásico puede durar más de 10 años, en el cual un gran número de compuestos (aproximadamente 10 000 compuestos/ año) que son aislados y/o sintetizados inician como candidatos para determinar su actividad antineoplásica, y sólo un pequeño porcentaje llega a utilizarse en el área clínica (de 3 a 5 compuestos/ año).

Para llevar a cabo este proceso, es necesario realizar una evaluación preclínica y clínica. En la fase preclínica se deben determinar las características físico-químicas de la molécula como son: pKa, coeficiente de partición, solubilidad, estabilidad, permeabilidad, método de síntesis y método analítico; posteriormente se evalúa la actividad en modelos de cáncer *in-vitro* e *in vivo*; se realiza una formulación para después determinar su perfil farmacológico y toxicidad *in vivo*. La evaluación clínica dividida en tres fases, determina la eficacia y seguridad en pacientes (Figura 1).



Figura 1. Proceso para el desarrollo de fármacos.

El Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, USA (National Cancer Institute, NCI) ha desarrollado un programa como parte de los estudios preclínicos,

para la selección y evaluación de nuevos fármacos que contribuyan al tratamiento de las diferentes neoplasias. Dicho programa consiste en realizar un ensayo de preselección, a una sola dosis por 48 horas de exposición al compuesto sobre tres líneas celulares de cáncer: una de mama (MCF-7), una de sistema nervioso central (SF-268) y otra de cáncer de pulmón (NCI-H460). Los compuestos seleccionados deben cumplir con el criterio mínimo de inhibición del crecimiento que es, al menos en una de las tres líneas celulares probadas mostrar una inhibición del 32% mayor al que se observa con un fármaco control.

Las moléculas que son preseleccionadas, se evalúan en 60 o hasta 75 líneas celulares para determinar su  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50, definida como la concentración a la cual un compuesto inhibe el 50% del crecimiento de la población celular) a 5 concentraciones desde 0.01-100  $\mu\text{M}$ ; y se eligen aquellos que tengan una  $CI_{50}$  menor o igual a 1  $\mu\text{M}$ , o que presenten especificidad sobre alguna de las líneas celulares.

Una vez terminada la selección *in-vitro* se realizan estudios *in-vivo*, por medio del modelo de inducción de tumores en ratones atímicos, utilizando 12 líneas celulares, 2 de cada tipo de cáncer humano: mama, colon, pulmón, melanoma, cerebro y ovario. Se considera la disminución del tamaño del tumor respecto al tiempo para la selección de moléculas activas. Y si se conoce que actúa sobre una molécula diana, se realizan estudios adicionales para establecer el mecanismo de regulación de dicha molécula.

Una vez que se realiza la formulación farmacéutica, se llevan a cabo los perfiles farmacológicos y toxicológicos *in-vivo*. La Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA), requiere reportes farmacológicos y toxicológicos de los estudios en al menos 2 especies, y que se incluya una no roedora (figura 2).

Los ensayos *in-vitro* de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de origen humano representa un método estándar para la selección de fármacos antineoplásicos. Permite la selección simultánea de gran número de nuevas moléculas con relativa facilidad. El parámetro que se emplea en este tipo de ensayos es la  $CI_{50}$ . Sin embargo, la principal desventaja es que no se puede identificar si el fármaco requiere una activación metabólica para que sea activo en

los pacientes, o que el metabolismo de cada persona pueda inactivarlo. Además, no proporciona información de la toxicidad sistémica ya que el modelo *in-vitro* no es representativo de la población celular en el tejido tumoral (Budman y col., 2003).

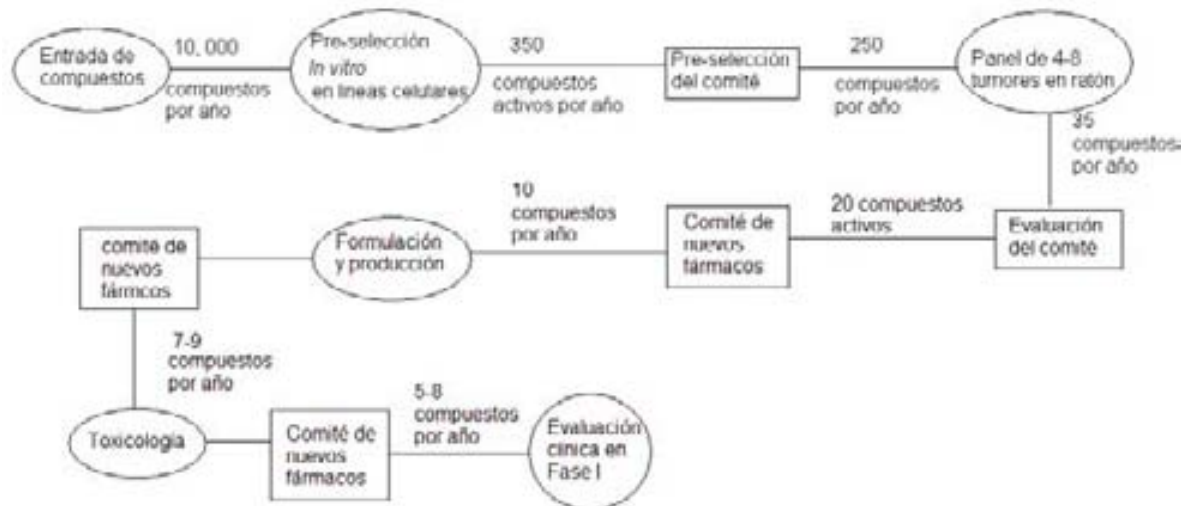


Figura 2. Programa de selección y evaluación de nuevos fármacos del NCI (Nationale Cancer Institute).

Una vez que se cumple con los requisitos de actividad y especificidad en el estudio preclínico se valora la actividad clínica. Se realizan protocolos de Fase I en pacientes con cáncer avanzado quienes no hayan respondido a la terapia estándar con la finalidad de determinar la seguridad del fármaco relacionada con la dosis. Los pacientes seleccionados deben cumplir los siguientes requisitos: 1) que su estado de salud le permita tener actividad física no menor del 60%; 2) con funciones hepáticas, renales y hematopoyéticas normales; 3) no haber recibido radio y quimioterapia dentro de un lapso de tiempo específico; 4) no presentar otro padecimiento adicional; 5) y otorgar un consentimiento firmado. Se eligen 3 pacientes para cada escalamiento de dosis (esquema de Fibonacci), tomando como dosis inicial desde 1/6 hasta 1/20 de la dosis letal 10 (LD<sub>10</sub>) en la especie más sensible de acuerdo a los estudios toxicológicos.

En los estudios de Fase II se determina la eficacia del fármaco sobre algún tipo de tumor específico. El tipo de tumor se elige independiente a los resultados de estudios preclínicos. Para dichos estudios se aplican dosis establecidas en Fase I, y



el número de pacientes que se requieren dependerá del nivel de confianza solicitado y el grado de respuesta al fármaco.

En la Fase III se compara el tratamiento directamente con la terapia estándar para evaluar su eficacia. Sólo se aplica para fármacos que presentan una actividad significativa en la Fase II. Se comparan tratamientos en diferentes grupos que se clasifican ya sea por edad, función del órgano, características del tumor o alcance de la enfermedad. Se requiere un gran número de pacientes para demostrar diferencias significativas entre varios grupos y tratamientos, ya que en la mayoría de casos la diferencia es pequeña (Perry, 1992).

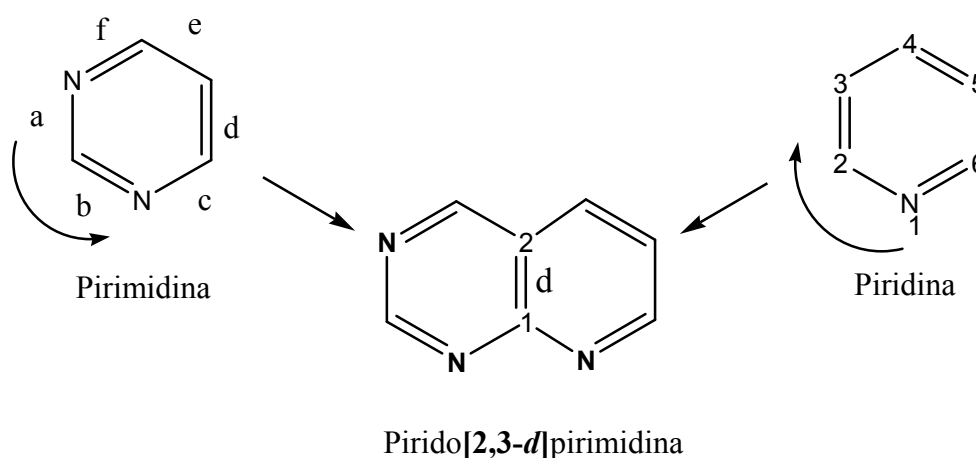
A continuación se presentan antecedentes correspondientes a pirido[2,3-d]pirimidinas y  $\alpha$ -alquilcetonas.

### 1.3 Pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

Como parte del desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos en los últimos 30 años se han investigado las propiedades y mecanismos citotóxicos de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas. Estas moléculas son heterociclos aromáticos con átomos de nitrógeno en su estructura, cuyo núcleo se presenta en la figura 3.

Para nombrar este tipo de heterociclos, se elige como anillo base el que contenga el mayor número de heteroátomos, en este caso se trata de la pirimidina; y al anillo correspondiente a la piridina se le asigna el prefijo “*pirido*”.

El anillo piridínico se enumera a partir del nitrógeno hacia la izquierda de tal modo que los carbonos que también forman parte de la pirimidina presenten la menor numeración posible. Para cada enlace de la pirimidina se asigna una letra minúscula del abecedario a partir de los enlaces con el nitrógeno hacia la derecha. Al identificar el enlace compartido entre los dos heteroanillos se escribe entre corchetes los números y la letra correspondientes a los carbonos que forman dicho enlace (figura 3).



**Figura 3** Estructura base de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y la numeración adecuada para nombrarlas.

### 1.3.1 Métodos de obtención para pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

En la actualidad existen varios métodos para sintetizar este tipo de heterociclos, la mayoría utiliza calentamiento a reflujo y solventes orgánicos, lo cual origina un costo mayor en la obtención de dichas moléculas. La propuesta de Woo y col., incluyeron una acetamidina en la posición 6 de iodouracilos que reacciona con acetileno a una temperatura de 120 °C en DMF (dimetil formamida).

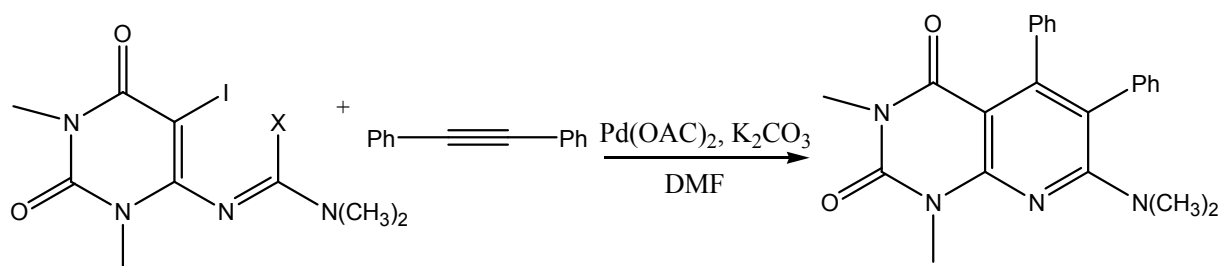


Figura 4. Síntesis reportada por Woo y col., 2000.

Bagley realizó un estudio donde sintetiza pirido[2,3-*d*]pirimidinas a partir de aminouracilo y alquínilcetonas para evaluar diferentes condiciones de reacción, encontrando que con el método B se obtenía un mayor rendimiento (figura 5).

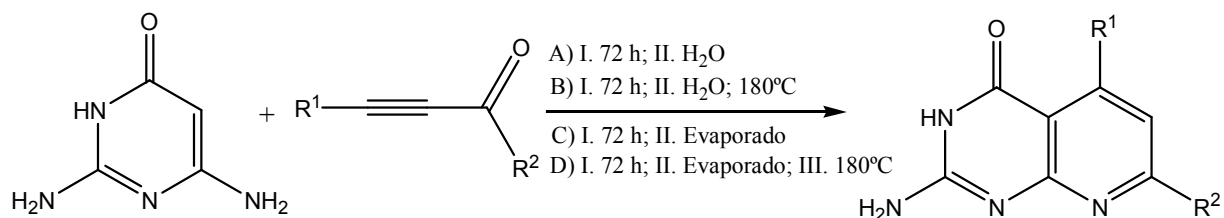


Figura 5. Evaluación de la síntesis de pirido[2,3-*d*]pirimidinas, en distintas condiciones de reacción (Bagley, 2001).

Hoy en día, aún se siguen utilizando métodos que emplean solventes orgánicos, calentamiento y se realizan en 2 pasos, con lo cual se eleva el costo de síntesis. En la figura 6 se observa una ciclocondensación reportada por Ragab y col., donde forman un intermediario a partir de 6-amino-2-tiouracilo y un benzaldehído; dicho intermediario finalmente reacciona con un acetileno para formar la piridopirimidina correspondiente.

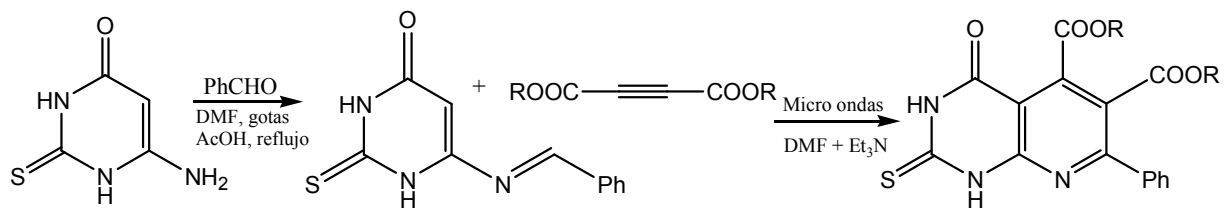


Figura 6. Ciclocondensación propuesta por Ragab y col., 2007.

Sin embargo, se tiene la propuesta de Rosas y col. (2001), donde por medio de un sistema catalítico en medio acuoso a temperatura ambiente y presión atmosférica se pueden obtener piridopirimidinas.

Cabe mencionar, que éste fue el método por el cual se sintetizaron las pirido[2,3-*d*]pirimidinas evaluadas en este trabajo, utilizando  $\alpha$ -alquínilcetonas como materia prima. La versatilidad del método permite incluir sustituyentes inorgánicos como el ferroceno, abatiendo los costos de síntesis. Este método se empleó para obtener las primeras ferrocenil pirido[2,3-*d*]pirimidinas a partir de ferrocenilcetonas (figura 7).

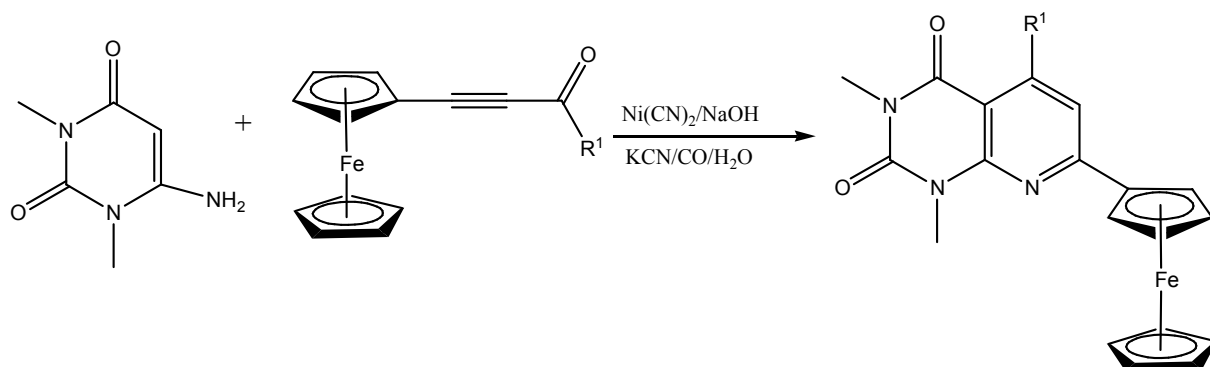


Figura 7. Síntesis de ferrocenil pirido[2,3-*d*]pirimidinas por medio del sistema catalítico  $\text{Ni}(\text{CN})_2/\text{NaOH}/\text{KCN}/\text{CO}/\text{H}_2\text{O}$ , Arellano y col., 2007.

### 1.3.2 Actividad biológica de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas.

La síntesis de análogos de estos compuestos ha causado gran interés por la amplia variedad de actividades que se han determinado como: actividad antibiótica (Matsumoto & Minami, 1975), antifúngica (Kumar y col., 2001), antiinflamatoria (Nam y col., 2001), antiviral (Bondy y col., 2008) y antineoplásica (Grivsky y col., 1980) (Dorsey y col., 2000). El mecanismo por el cual dichos heterociclos tienen una actividad tan versátil es que son capaces de inhibir varias enzimas como la

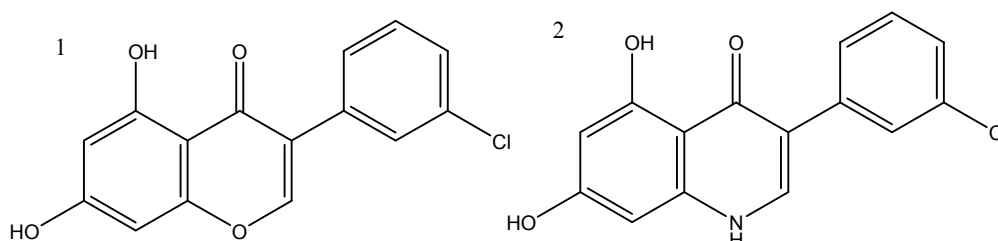
dihidrofolato reductasa, proteínas cinasas (tirosina cinasas y cinasas dependientes de ciclinas) y fosfodiesterasas.

En los últimos 20 años en el estudio de las piridopirimidinas se han determinado diferentes mecanismos por medio de los cuales presentan un efecto citotóxico, como se describe a continuación.

Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas se han relacionado como antagonistas del folato (Degraw, 1974). Se demostró que estas moléculas tienen mayor actividad citotóxica y antitumoral sobre células de carcinoma de mama de rata (W256), en comparación con el metotrexato que es una pirazino[2,3-*d*]pirimidina (Grivsky y col., 1980). Los antagonistas del folato actúan inhibiendo la enzima de dihidrofolato reductasa (DHFR), la cual reduce al 7,8-dihidrofolato a 5,10-metileno-tetrahidrofolato dentro de la ruta de metilación necesaria para la formación de nucleótidos de timidina (nucleótido pirimidínico que forma parte de la estructura del ADN) (Avendaño, 2001).

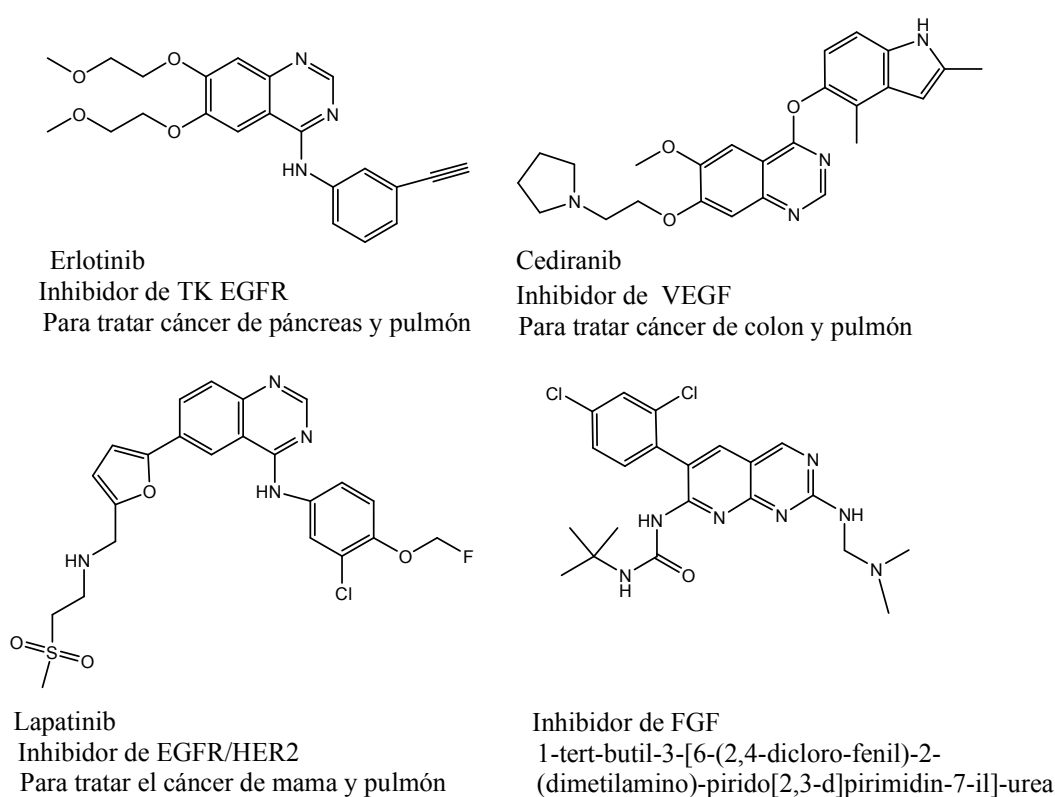
Las tirosina-cinasas juegan un papel crucial en muchos procesos de las células, como mitogénesis, diferenciación, oncogénesis, angiogénesis, apoptosis, señalización de neurotransmisores y activación plaquetaria; la unión con sus ligandos desencadena reacciones que activan o inhiben cada uno de los eventos anteriores. Algunos oncogenes codifican para enzimas-receptores defectuosas en el sitio de enlace al ligando, lo que desequilibra la regulación en la actividad de la tirosina-cinasa, quedando la señal de división celular activada constitutivamente independiente a la presencia de factores de crecimiento (Nelson y col., 2005).

De acuerdo con estudios SAR (análisis de relación estructura-actividad) y de cristalización por rayos-X, se obtuvieron modelos de una estructura farmacófora usada como inhibidor de tirosina cinasa del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidermal); los cuales se muestran en la figura 8, el compuesto No. 2 resultó 10 veces más potente y selectivo que el compuesto No. 1 (Al-Obeidi & Lam, 2000).



**Figura 8. Estructuras de los farmacóforos elucidados como inhibidores de tirosina cinasas, el compuesto (1) [3-(3-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-4-cromona] resultó menos activo que el compuesto (2) [3-(3-cloro-fenil)-5,7-dihidroxi-*[1H]*-4-quinolinona]**

En base a lo anterior, los heterociclos que contienen nitrógeno en su estructura fueron elegidos para el desarrollo de inhibidores de tirosina cinasas comerciales como erlotinib (Wedge y col., 2005), cediranib (Petty, 2003) y lapatinib (Nelson y col., 2006), los cuales tienen similitud estructural con pirido[2,3-*d*]pirimidinas que presentan actividad inhibitoria sobre tirosina cinasas de factores de crecimiento (Hamby y col., 1997; Connolly y col., 1997), como se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Comparación estructural entre una pirido[2,3-*d*]pirimidina con inhibidores de tirosina cinasa utilizados en el ámbito clínico.**

Recientemente se ha determinado la inhibición específica de TK de Bcr-Abl y de EGFR, dada por piridopirimidinas obteniendo buena respuesta en líneas celulares de leucemia y cáncer de colon respectivamente (Dorsey y col., 2000; Zhou y col., 2006), lo cual da amplias expectativas para este tipo de moléculas.

A partir de estudios SAR, se han seleccionado moléculas que son 1000 veces más selectivas para CDK's (cinasas dependientes de ciclinas) que para TKs (tirosina-cinasas), y se ha observado que resulta necesario que la molécula presente

una amina aromática en su estructura para potenciar la inhibición (Barvian y col., 2000). Análogos de piridopirimidinas han presentado mayor selectividad y efecto antitumoral para CDK4/ciclina D (Sielecki y col., 2000). Se siguen sintetizando piridopirimidinas, buscando que actúen inhibiendo complejos de ciclina-cinasas que controlan el cambio de fase de G2 a M (Tu y col., 2006; Hashimoto y col., 2006).

En la actualidad, para mejorar el efecto antineoplásico se han obtenido análogos de piridopirimidinas como promotores de la activación de la caspasa 3 y de la fragmentación de ADN, además producen un arresto celular inhibiendo la transcripción (Cordeau y col., 2007).

Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas aquí evaluadas fueron obtenidas por medio del sistema catalítico NaOH/Ni(CN)<sub>2</sub>/KCN/CO/H<sub>2</sub>O, y posteriormente se evaluaron para conocer su actividad antioxidante y antiinflamatoria, como lo reportan Arellano (2004) y García (2005) en sus tesis de licenciatura.

En la tabla 3 se muestra una inhibición de lipoperoxidación menor al 20%, indicando una baja actividad antioxidante de las cuatro moléculas. Y la actividad antiinflamatoria evaluada por la inhibición de edema en oreja de rata resultó significativa para el compuesto *i*; para los compuestos del *ii* al *vi* la inhibición fue menor del 40%.

Por lo anterior se planteó la importancia de evaluar la posible actividad citotóxica de los compuestos del *i* al *iv* en líneas celulares de cáncer, ya que se consideraron moléculas que podrían presentar actividad antineoplásica y que se obtienen por un método de bajo costo y con buen rendimiento (>50%).

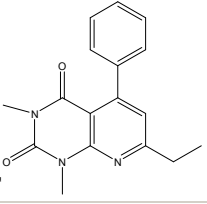
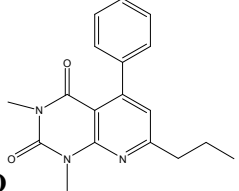
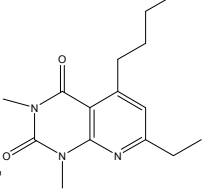
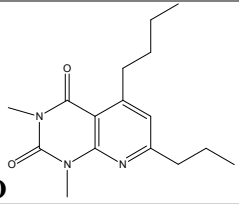
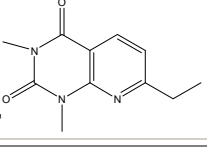
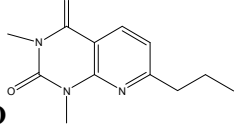
Compuesto	Rendimiento de la síntesis (%)	% de inhibición de lipoperoxidación	% de inhibición de edema
i. <b>PPHET</b> 	74	8.04	63.5
ii. <b>PPHPRO</b> 	67	3.39	7.9
iii. <b>PBUET</b> 	65	4.7	34.0
iv. <b>PBUPRO</b> 	58	10.83	21.6
v. <b>PHET</b> 	73	9.07	35.3
vi. <b>PHPRO</b> 	70	19.9	38.9

Tabla 3. Evaluación antioxidante y antiinflamatoria de pirido[2,3-*d*]pirimidinas obtenidas por medio del sistema catalítico NaOH/Ni(CN)<sub>2</sub>/KCN/CO/H<sub>2</sub>O.



## 1.4 $\alpha$ -Alquinilcetonas.

La estructura de estas moléculas presentan un alquino en el carbono alfa al grupo carbonilo, como se muestra en la figura 10. No se ha determinado la actividad biológica de este tipo de compuestos, ni existen reportes de su actividad citotóxica. Sin embargo, se utilizan ampliamente dentro de la síntesis orgánica e inorgánica.

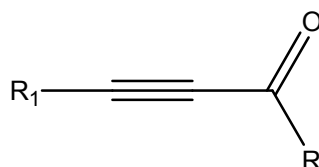


Figura 10. Estructura de una  $\alpha$ -alquinilcetona

### 1.4.1 Síntesis de $\alpha$ -alquinilcetonas.

La vía principal de síntesis de alquinilcetonas, se estableció por Sonogashira en 1977, mediante el acoplamiento entre alquinos terminales y cloruros de acilo en presencia de  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{CuI}$  y trietilamina, bajo atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente (figura 11).

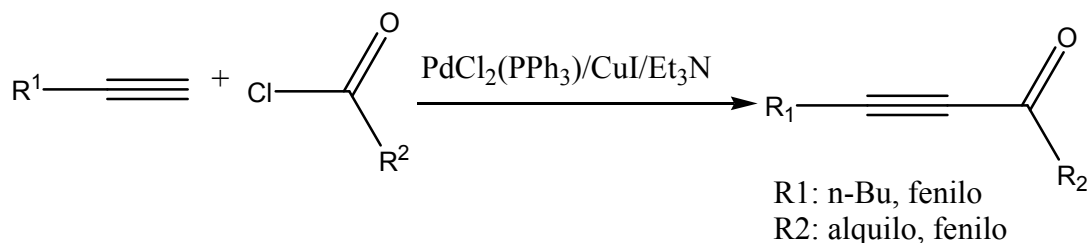


Figura 11. Síntesis de  $\alpha$ -alquinilcetonas por acoplamiento de Sonogashira (Tohda y col., 1977).

La síntesis de ferrocenilcetonas ha sido importante para obtener heterociclos que presentan en su estructura al grupo ferrocenilo. Por lo que se utilizó una modificación del acoplamiento de Sonogashira (Juxing y col., 2004) para la síntesis de ferrocenilcetonas, la cual utiliza como alquino terminal al etinilferroceno, bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente (Figura

12).

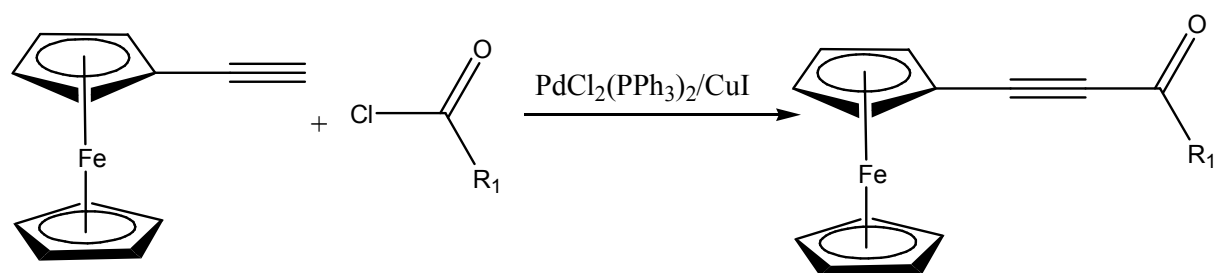


Figura 12 Síntesis de  $\alpha$ -alquínilcetonas por medio de la modificación de Juxing.

#### 1.4.2 Reacciones que involucran $\alpha$ -alquínilcetonas en síntesis de heterociclos.

Las  $\alpha$ -alquínilcetonas se utilizan como sustrato para la síntesis de heterociclos, por la capacidad de presentar reacciones de adición y ciclización. Se tienen reportadas la síntesis de quinolinas (Korivi & Cheng, 2006), quinolinonas (Rosas y col., 2003), piridopirimidinas (Bagley y col., 2001), lactonas (Arzoumanian y col., 1995),  $\gamma$ -lactamas (Arzoumanian y col., 1997), oxacinonas (Rosas y col., 2003) e hidrazonas (Adelco y col., 2008).

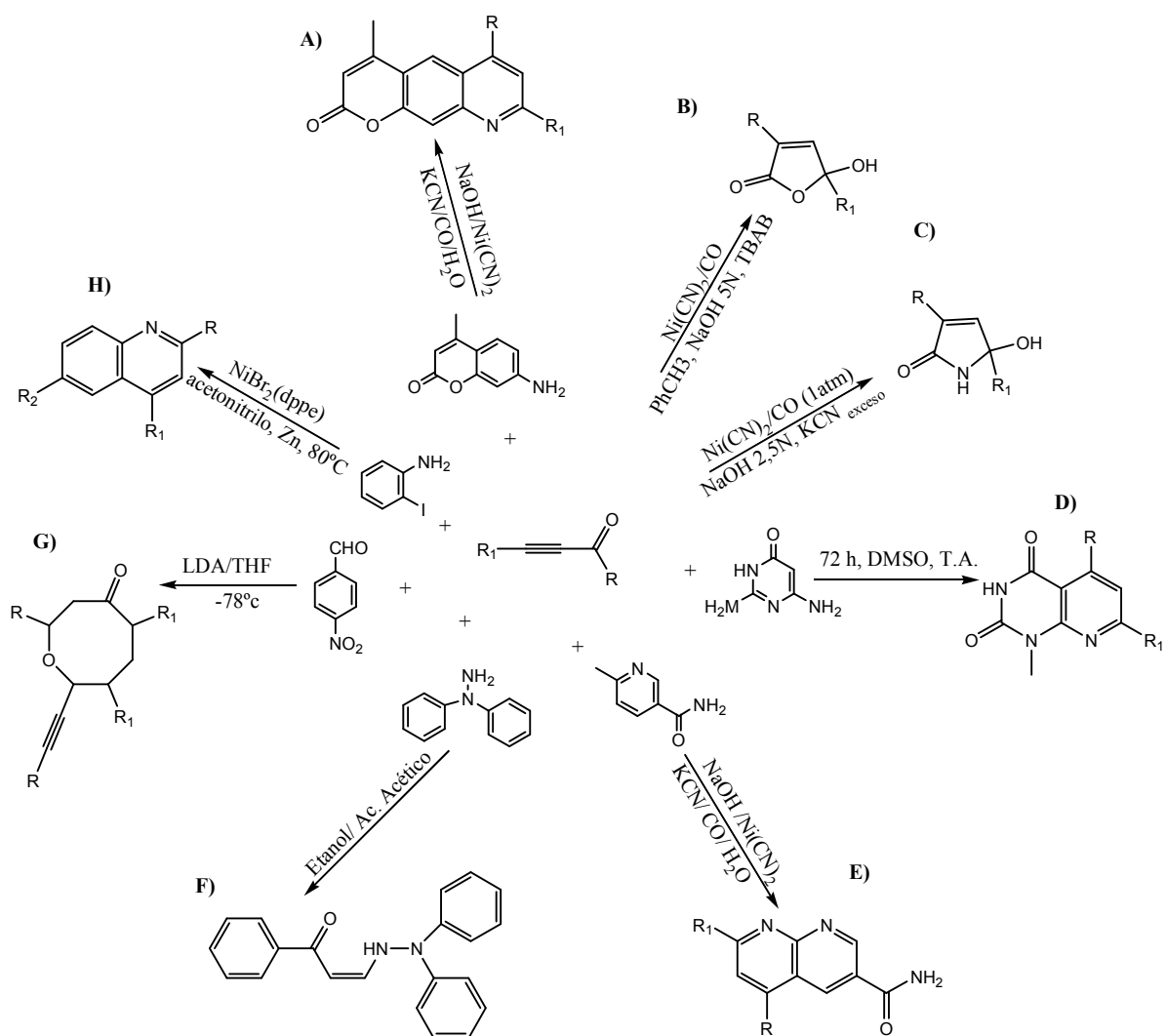


Figura 13. Reacciones donde se utilizan  $\alpha$ -alquinilcetonas como sustratos para la síntesis de quinolinonas (A), lactonas (B), gama-lactamas (C), piridopirimidinas (D), naftiridinas (E), hidrazonas (F), oxacinonas (G) y quinolinas (H).

### 1.4.3 Actividad biológica relacionada con el ferroceno.

El ferroceno es un metaloceno de importancia biológica que se utiliza como sustituyente de grupos fenílicos, pues le confiere una mayor lipofilidad a las moléculas con lo que aumenta su permeabilidad en la membrana celular. Se ha incluido en moléculas con actividad citotóxica (Casas, 2004; Kowalsky y col., 2006; Poelhsitz y co.l, 2007), antiparasitaria (Wu y col., 2006) y antitumoral (Bincolletto y col., 2005) (figura 14).

Top y col., han incluido al ferroceno en la molécula de tamoxifeno (antagonista del receptor a estrógeno), y demostraron que el daño a nivel de ADN es mayor a comparación de aquellos donde el ferroceno está ausente; en consecuencia aumenta su efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer de mama dependientes de estrógenos (Top y col., 2001; Vessiéres y col., 2006). Actualmente se tiene en desarrollo la formulación liposomal de los análogos de tamoxifeno con ferroceno para su evaluación clínica (Nguyenb y col., 2008).

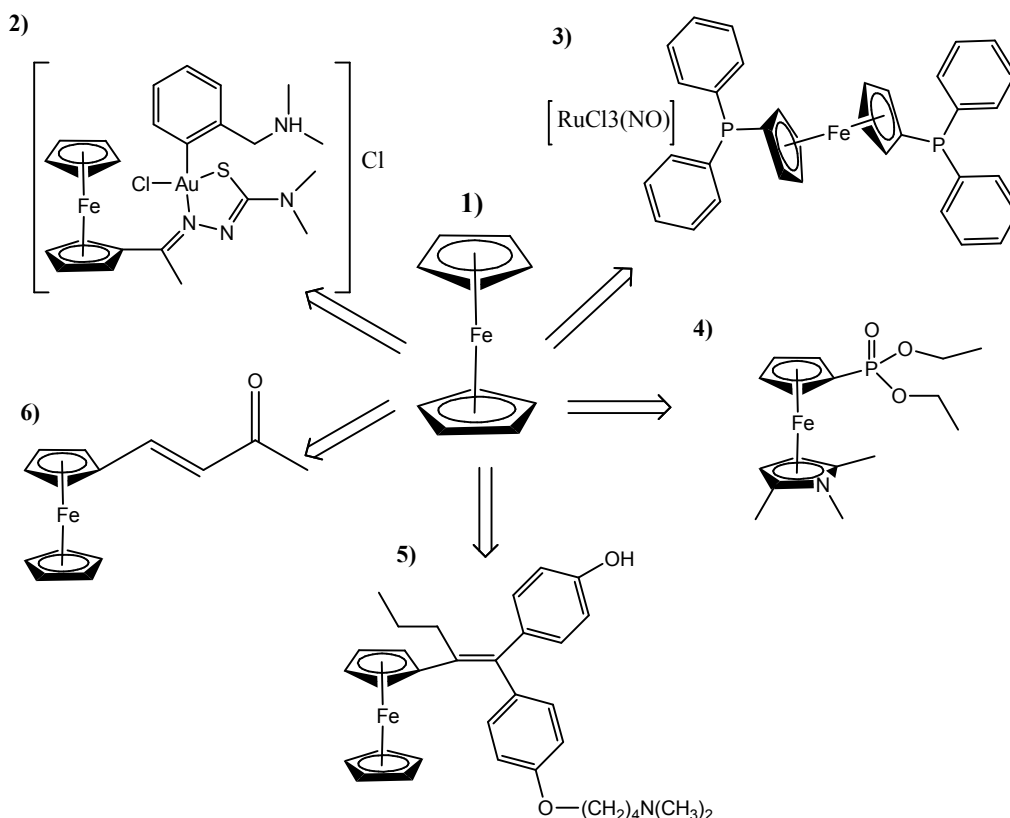


Figura 14. Moléculas con actividad citotóxica que incluyen al ferroceno (1) como complejos con tiosemicarbazonas (2), complejos con difenilfosfinas (3), fosfonatos (4), tamoxifeno (5) y chalconas (6).

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo general.

Evaluar la actividad citotóxica de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y  $\alpha$ -alquinilcetonas en líneas celulares de cáncer.

### 2.2 Objetivos particulares.

- ⊗ Evaluar el efecto citotóxico de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas sustituidas con grupos alquilo o fenilo en la posición 5 y 7, en tres líneas celulares de cáncer (HeLa, MCF-7 y SW-480).
- ⊗ Determinar la actividad citotóxica de las  $\alpha$ -alquinilcetonas susituidas con un grupo toluido en posición orto, meta y para en líneas celulares de cáncer.
- ⊗ Determinar la citotoxicidad de las  $\alpha$ -alquinilcetonas sustituidas con un grupo ferrocenilo en la posición 3.

## 1. HIPÓTESIS.

Se ha reportado que moléculas análogas a las piridopirimidinas presentan una actividad antineoplásica, por lo que se espera que las pirido[2,3-*d*]pirimidinas sustituidas con grupos fenilo o alquilo en la posición 5 y 7 demuestren un efecto citotóxico sobre líneas celulares de cáncer.

El grupo ferrocenilo en compuestos con actividad antineoplásica proporciona características redox y aumenta la actividad citotóxica, por lo que se espera observar un efecto citotóxico mayor en las  $\alpha$ -alquinilcetonas sustituidas con un grupo ferrocenilo.

## **4. METODOLOGÍA.**

### **4.1 Proliferación celular.**

Se utilizaron 3 líneas celulares de diferente origen, una de cervix (HeLa), otra de mama (MCF-7) y una más de colón (SW-480). Las células se cultivaron en botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF).

Las botellas de cultivo se mantuvieron en una incubadora (Nuaire vs autoflow NU 4750) bajo una atmósfera húmeda a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2 Sembrado de células.**

Cuando las células tuvieron una confluencia de alrededor de 70%, se retiró el medio de cultivo y se lavaron con 10 mL de PBS (buffer de fosfatos al 136 mM de NaCl, 2.6 mM de KCl, 4.02 mM de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.8 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; con un pH=7.3).

Posteriormente las células se levantaron con 2 mL de PBS-EDTA 1 mM (pH=7.3), las células se resuspendieron en 8 mL de medio y se contaron en un hemocitómetro. Por último, las células se centrifugaron a 1000 rpm por 10 minutos (centrífuga Eppendorf-5702R) para eliminar el EDTA y fueron resuspendidas en medio RPMI.

Se sembraron 3 placas de 96 pozos con 8000 células en un volumen total de 100 µL por pozo. Las placas de 96 pozos se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3 Evaluación del efecto citotóxico de piridopirimidinas y alquinilcetonas.**

Una vez formada la monocapa, se retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco con la concentración correspondiente del compuesto a probar. Para las pirido[2,3-*d*]pirimidinas las concentraciones probadas fueron 0.1, 3.3, 10, 33, 100 y 700 µM y para las α-alquinilcetonas fueron 0.1, 10, 33, 100 y 300 µM. Al grupo control se añadió medio de cultivo con 2% del disolvente correspondiente en cada caso, DMSO/etanol (7:3) en las evaluaciones de piridopirimidinas y etanol para α-alquinilcetonas.

Como controles positivos se usaron doxorrubicina, cis-platino y 5-fluorouracilo, para las líneas celulares MCF -7, HeLa y SW-480, respectivamente, como se indica en la tabla 4.

Control positivo	Línea celular	Compuesto a evaluar ** Se utilizó una clave para cada compuesto la cual se muestra entre paréntesis.	
Doxorrubicina	MCF-7	<b>Piridopirimidinas</b>  I. 5-fenil-1,3-dimetil-7-propil-pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4-diona ( <b><i>PPhPro</i></b> )  II. 7-etil-5-fenil-1,3-dimetil-pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4-diona ( <b><i>PPhEt</i></b> )  III. 5-butil-1,3-dimetil-7-propil-pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4-diona ( <b><i>PBuPro</i></b> )  IV. 5-butil-7-etil-1,3-dimetil-pirido[2,3- <i>d</i> ]pirimidin-2,4-diona ( <b><i>PBuEt</i></b> )	<b><math>\alpha</math>-Alquinilcetonas</b>  V. 3-ferrocenil-1-(2-metilfenil)-2-propinona ( <b><i>AFcoMePh</i></b> )  VI. 3-ferrocenil-1-(3-metilfenil)-2-propinona ( <b><i>AFcmMePh</i></b> )  VII. 3-ferrocenil-1-(4-metilfenil)-2-propinona ( <b><i>AFcpMePh</i></b> )  VIII. 1,3-difenil-2-propinona ( <b><i>APhPh</i></b> )
cis-Platino	HeLa		
5-Fluorouracilo	SW-480		

Tabla 1. Nombre de los compuestos a evaluar sobre las 3 líneas celulares de cáncer con su control positivo correspondiente.

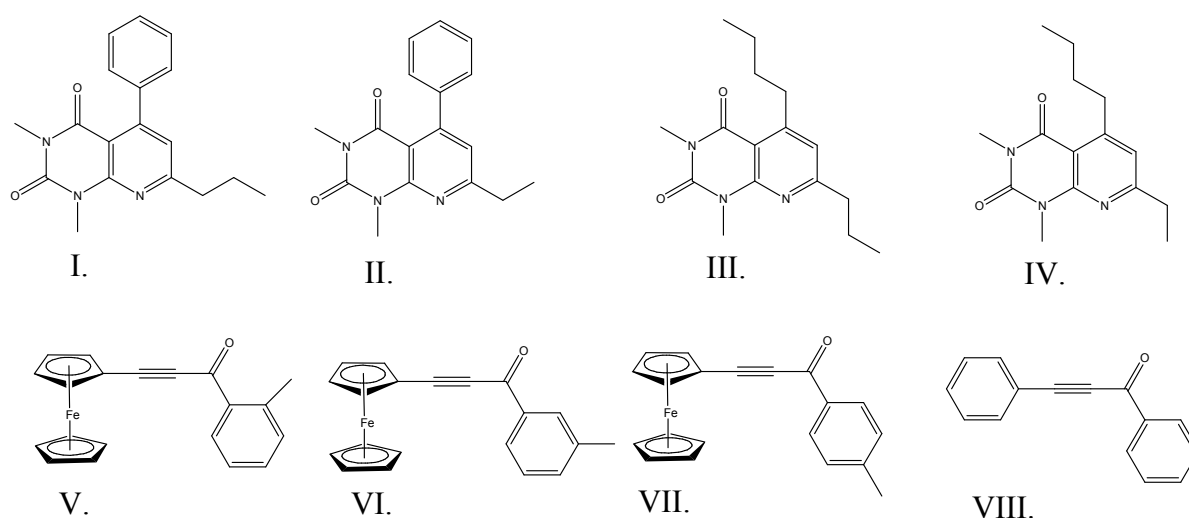


Figura 1. Estructura química de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas (I-IV) y  $\alpha$ -alquinilcetonas (V-VIII) evaluadas

#### **4.4 Determinación del porcentaje de viabilidad celular.**

Para determinar la viabilidad celular después de la exposición a las piridopirimidinas y  $\alpha$ -alquinilcetonas se utilizaron dos métodos, una prueba metabólica (XTT) y una prueba de tinción con cristal violeta (CV).

La prueba metabólica se realizó utilizando XTT (Roche). El XTT es una sal de tetrazolio (*3-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-metoxi-6-nitro)]-disulfonato de benceno*) la cual es transformada en formazán mediante un complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa y es activo sólo en el caso de células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán producida durante el ensayo, está relacionada con el número de células metabólicamente activas. Esto se evaluó midiendo la absorbancia en un lector de placa Multiskan (Fischer Scientific) a 492 nm con corrección a 690 nm.

La determinación de viabilidad celular con cristal violeta se realiza después de haber fijado las células vivas con formaldehído al 10% y posteriormente poder teñir con colorante de cristal-violeta al 0.1%. Por lo que se relaciona la intensidad de colorante con la cantidad de células vivas, midiendo la absorbancia en un lector de placa Multiskan a 570 nm.

#### **4.5 Preparación de las soluciones Stock.**

##### Pirido-[2,3-d]pirimidinas.

Se pesaron 5 mg de cada compuesto en un tubo eppendorf y se agregaron 500  $\mu$ L de DMSO/etanol (7:3). Se agitaron vigorosamente en un vortex (Fischer Genie 2) hasta la disolución completa. Se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

##### $\alpha$ -Alquinilcetonas.

Se pesaron 5 mg de cada compuesto en un tubo eppendorf y se agregaron 500  $\mu$ L de etanol. Se agitó vigorosamente en un vortex hasta la disolución completa. Se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

##### cis-Platino.

Se pesaron 5 mg de cis-platino en un tubo de 15 mL y se agregaron 5 mL de SSI (solución salina isotónica). Se agitó en un vortex vigorosamente hasta la disolución completa. Se almacenó a -20 °C hasta su utilización.



### Doxorrubicina.

Se utilizó un lote comercial cuya concentración es 2 mg/mL, el cual se almacenó a -20 °C protegido de la luz.

### 5-Fluorouracilo.

Se pesaron 80 mg de 5-FU y se agregaron 1600 µL de una solución de NaOH al 20% (50 mg/ml), se agitó vigorosamente en un vortex hasta su disolución completa. Se almacenó a -20 °C protegido de la luz.

## **4.6 Evaluación estadística.**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey, para comparar diferencias estadísticamente significativas se utilizó un valor de  $p \leq 0.05$ .

## **4.7 Pruebas de solubilidad.**

Se determinó la solubilidad de los compuestos a evaluar en tres disolventes: DMSO (dimetil sulfóxido), etanol y agua, para elegir el mejor disolvente a utilizar en las pruebas de citotoxicidad. Se pesó en un tubo eppendorf 1 mg de cada uno de los compuestos y se adicionó poco a poco una cantidad de disolvente correspondiente a cada categoría de solubilidad, agitando entre cada adición conforme se muestra en la tabla 5 (FEUM, 2004).

<b>Proporción soluto (1 mg):disolvente (µL)</b>	<b>Criterio de solubilidad</b>
1: < 1	Muy soluble
1:10	Fácilmente soluble
1:30	Soluble
1:100	Poco soluble
1:1000	Ligeramente soluble
1:10 000	Muy ligeramente insoluble
1: > 10 000	Casi insoluble

Tabla 2. Criterio de solubilidad.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Pruebas de solubilidad.

Los resultados de las pruebas de solubilidad que se realizaron a los compuestos evaluados se muestran en la tabla 6. Los ocho compuestos resultaron insolubles en agua, las piridopirimidinas I y II resultaron ligeramente solubles en DMSO y poco solubles en etanol; las piridopirimidinas III y IV fueron solubles en etanol y poco solubles en DMSO.

En el caso de las alquinilcetonas (V – VIII), cambiaron su coloración de rojizo a negro después de 20 min de haberse disuelto en DMSO, por lo que se eligió al etanol como disolvente para estas moléculas a una concentración de 1 mg/100  $\mu$ L. Para las piridopirimidinas no se observó ningún cambio después de la disolución total, por lo que se utilizó una proporción 7:3 de DMSO/etanol.

COMPUESTO	Solubilidad en DMSO	Solubilidad en etanol	Solubilidad en agua
I. PPhPro	Ligeramente soluble	Poco soluble	Insoluble
II. PphEt	Ligeramente soluble	Poco soluble	Insoluble
III. PbuPro	Poco soluble	Soluble	Insoluble
IV. PBuEt	Poco soluble	Soluble	Insoluble
V. AFcoMePh	Soluble **	Poco soluble	Insoluble
VI. AFcmMePh	Poco soluble **	Poco soluble	Insoluble
VII. AFcpMePh	Poco soluble **	Casi insoluble	Insoluble
VIII. APhPh	Soluble **	Poco soluble	Insoluble

Tabla 1. Resultados de las pruebas de solubilidad de piridopirimidinas y alquinilcetonas evaluadas. Proporción soluto (mg)/ solvente ( $\mu$ L), para las categorías de: poco soluble (1/100), ligeramente soluble (1/1000), muy ligeramente soluble (1/10 000), casi insoluble (1/ >10 000).

\*\* Las alquinilcetonas disueltas en DMSO, presentaron descomposición.

La baja solubilidad es una limitante para evaluar adecuadamente la actividad biológica de los compuestos. En este caso es importante utilizar un disolvente que sea miscible en agua y que disuelva por completo al compuesto. Ya que una solubilidad incompleta, puede provocar una concentración errónea cuando en realidad la concentración es menor; lo que nos llevaría a subestimar la actividad de estas moléculas (Li Di & Kerns, 2006).

Para los ensayos de actividad biológica, se considera al DMSO como uno de los disolventes adecuados (en el 80% de las moléculas evaluadas) para alcanzar concentraciones entre 10 y 30 mM en la preparación de las soluciones Stock.

Un compuesto con buena solubilidad acuosa tiene mayor probabilidad de tener un desarrollo farmacológico exitoso, ya que de las moléculas que resultan activas sólo el 1% presenta baja solubilidad en agua. Sin embargo, esto no implica que las moléculas con baja solubilidad acuosa no presenten una respuesta citotóxica importante y sean consideradas como compuestos con un perfil farmacológico adecuado en oncología.

La tolerancia al DMSO varía dependiendo del tipo de ensayo, por lo que se debe determinar cual es el porcentaje de disolvente que no interfiere con el efecto que se desea evaluar, en este caso la citotoxicidad. Por ello se determinó como límite máximo utilizar el 2% de disolvente en la máxima concentración evaluada para las piridopirimidinas, con una proporción de DMSO/etanol de 7:3.

Aun cuando la solubilidad que se determinó es preliminar para realizar las pruebas de citotoxicidad, es importante complementar el estudio de solubilidad para continuar con el desarrollo farmacológico de la molécula. Esto significa que posteriormente debe realizarse un perfil de solubilidad a distintos valores de pH, determinar que estructuras cristalinas favorecen la solubilidad y además determinar la solubilidad termodinámica (Bhattachar y col., 2006).

## 5.2 Determinación de la citotoxicidad de pirido[2,3-*d*]pirimidinas y $\alpha$ -alquilacetonas por medio de la tinción con cristal violeta (CV).

Se evaluó el porcentaje de viabilidad celular de los ocho compuestos sobre las líneas celulares HeLa, MCF-7 y SW-480, utilizando el método de tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos con dicho método indican la misma tendencia que los determinados por medio del método de XTT, por lo que se determinó la relación lineal entre ambos métodos.

El coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) se muestra en la tabla 7, donde se observa que tanto para los fármacos controles utilizados como para los compuestos del III al VIII se obtuvieron  $R^2 > 0.9$  a los distintos tiempos de exposición.

Se observó una relación lineal entre ambos métodos utilizados en las evaluaciones de los compuestos del III al VIII, lo cual nos indica que el método de XTT y el método de CV son equivalentes para determinar el porcentaje de viabilidad celular (figura 16).

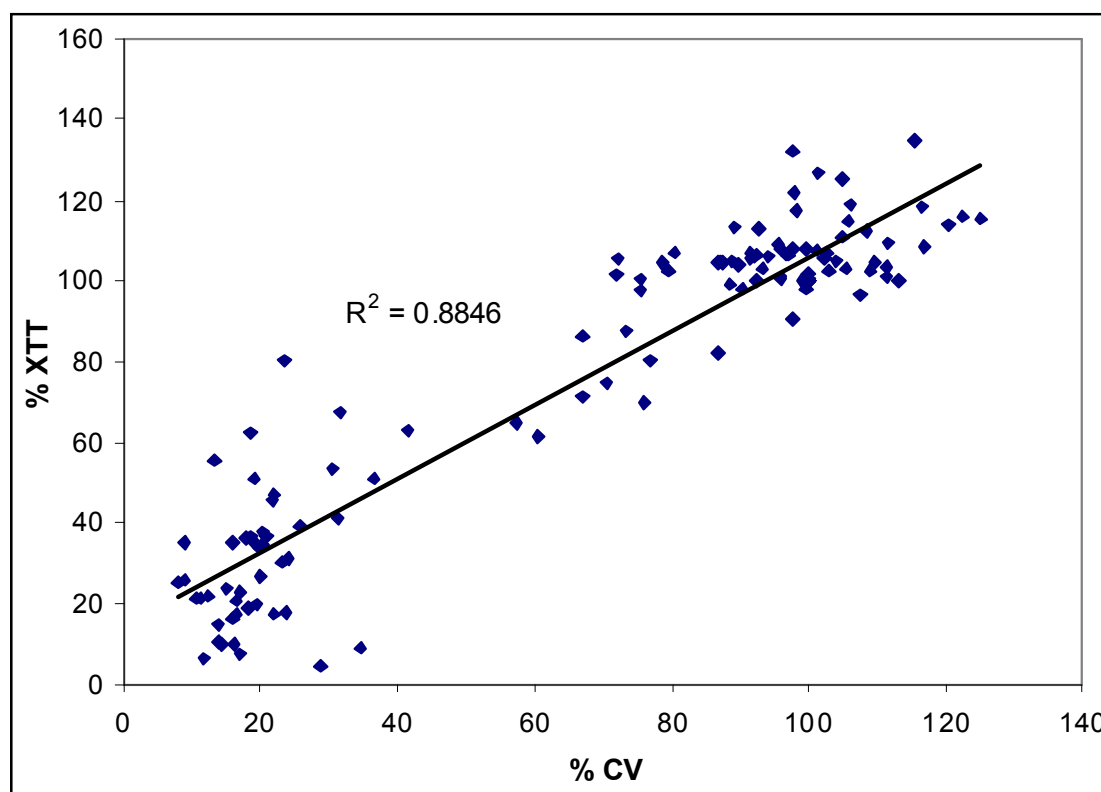


Figura 1. Porcentaje de viabilidad celular determinado para las pirido[2,3-*d*]pirimidinas y  $\alpha$ -alquilacetonas, obtenidos por medio de XTT y por medio de la tinción con cristal violeta (CV) a las 24 horas de exposición sobre las tres líneas celulares de cáncer.

Compuesto	HeLa			MCF-7			SW-480		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<b>control</b>	0.908	0.970	0.956	0.939	0.979	0.919	0.975	0.984	0.967
<b>I</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>II</b>	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
<b>III</b>	0.953	0.954	0.895	0.873	0.847	0.842	0.949	0.931	0.857
<b>IV</b>	0.909	0.972	0.983	0.925	0.913	0.944	0.948	0.962	0.904
<b>V</b>	0.945	0.899	0.989	0.973	0.965	0.992	0.919	0.979	0.969
<b>VI</b>	0.988	0.987	0.996	0.925	0.949	0.918	0.984	0.989	0.999
<b>VII</b>	0.930	0.832	0.979	0.923	0.905	0.938	0.913	0.971	0.990
<b>VIII</b>	0.969	0.979	0.994	0.949	0.988	0.967	0.973	0.968	0.972

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación lineal ( $R^2$ ) entre los porcentajes de viabilidad determinados por medio de XTT y la tinción con cristal violeta (CV). *NC: No citotóxico*

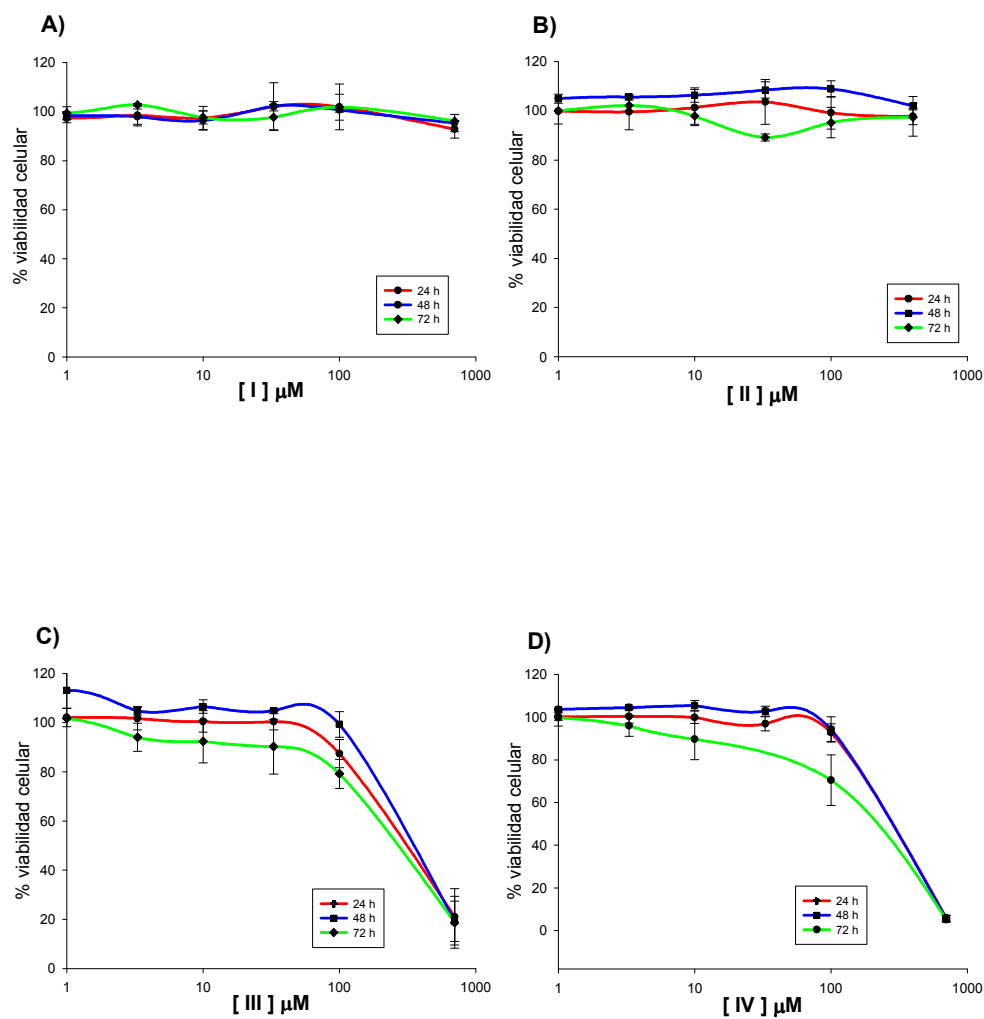
Al obtener la misma tendencia en la determinación del porcentaje de viabilidad celular por el método de XTT y por la tinción con CV, nos asegura que el efecto citotóxico que presentan las moléculas, es independiente al método utilizado e indica que sólo depende de la naturaleza química de dichas moléculas.

### **5.3 Resultados de la evaluación citotóxica de pirido[2,3-*d*]pirimidinas.**

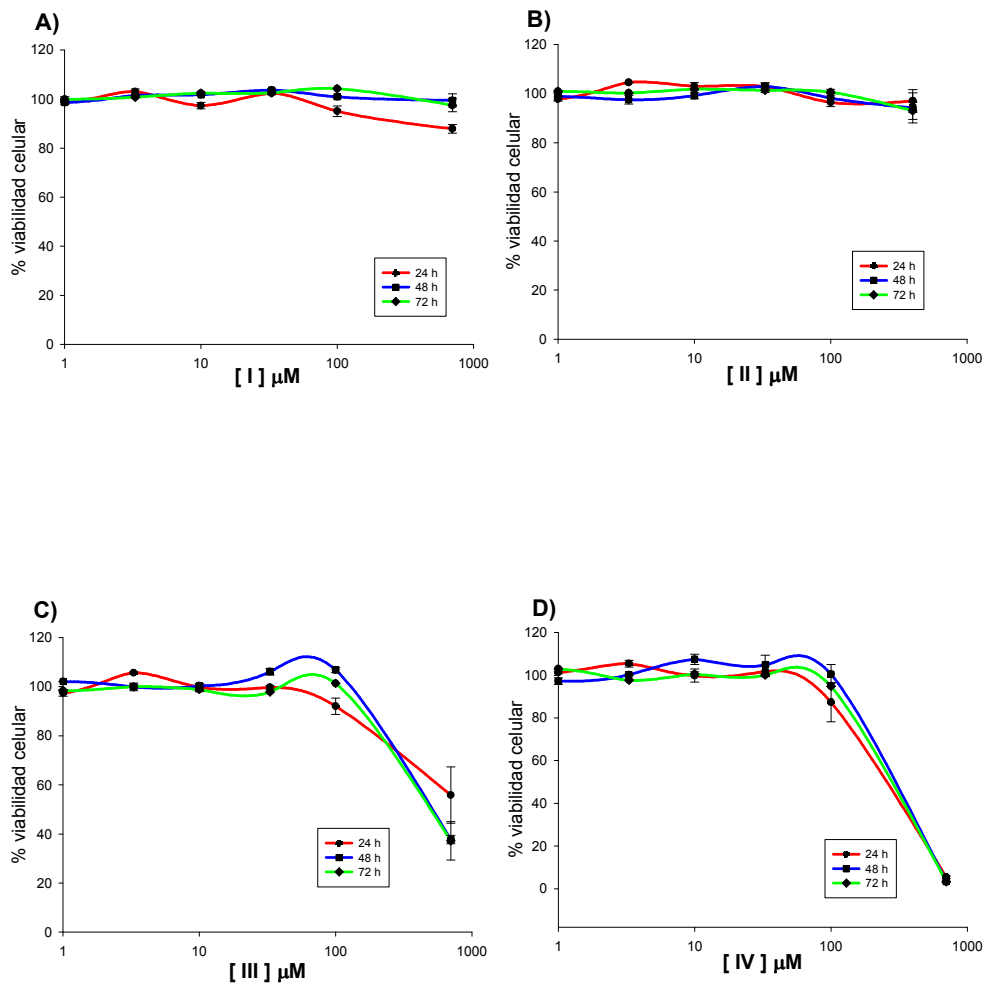
Las curvas que representan el porcentaje de viabilidad celular vs concentraciones crecientes de las piridopirimidinas sobre líneas celulares de cáncer de cervix (HeLa), de mama (MCF-7) y de colon (SW-480), se muestran en las figuras 17, 18 y 19, respectivamente.

En las tres líneas celulares se observó que los compuestos I y II, los cuales tienen un grupo fenilo en la posición 5, no presentaron actividad citotóxica a las concentraciones evaluadas (0.1-700  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, los compuestos sustituidos en la misma posición con un grupo butilo (III y IV) presentaron una disminución en el porcentaje de viabilidad celular a partir de una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

Las curvas dosis-respuesta determinadas a 24, 48 y 72 horas de exposición no presentaron diferencia significativa entre ellas.

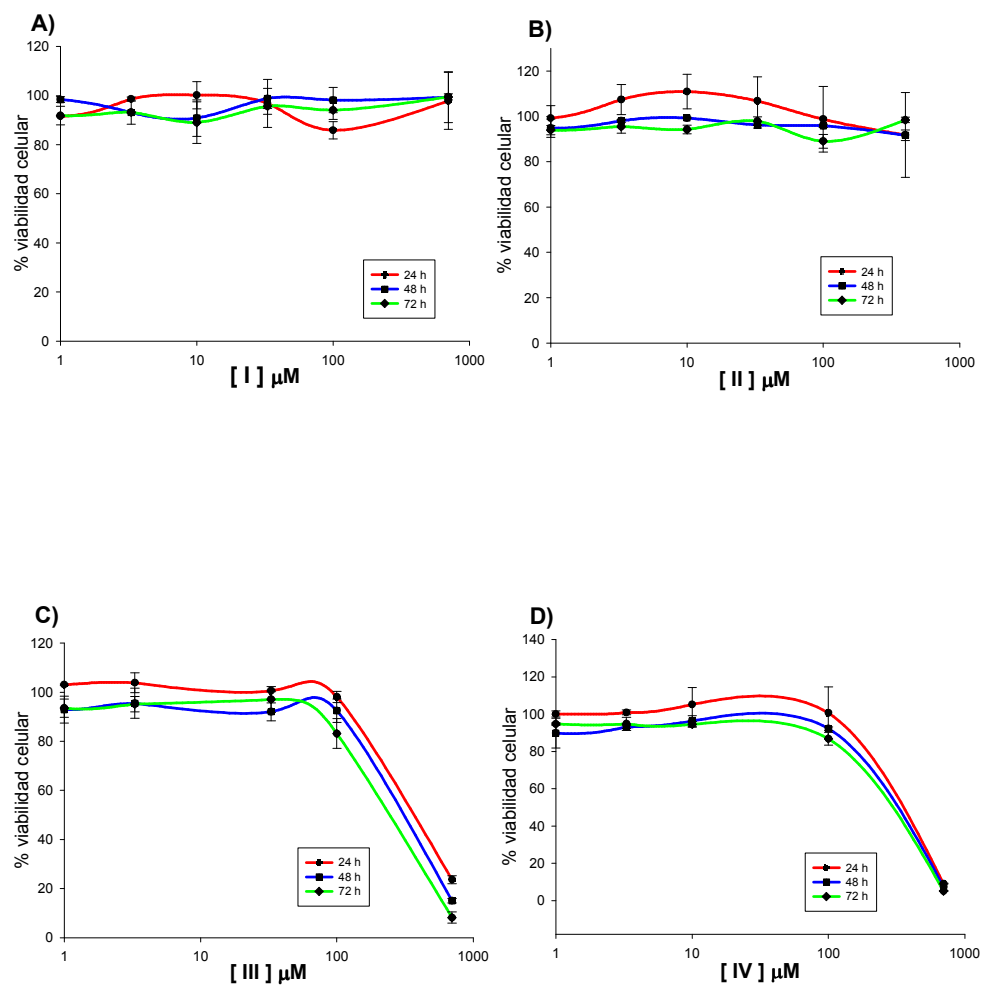


**Figura 2. Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de las pirido[2,3-d]pirimidinas sobre HeLa.** A) 5-fenil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-d] pirimidin-2,4-diona; B) 7-etil-5-fenil-1,3-dimetil pirido[2,3-d] pirimidin-2,4-diona; C) 5-butil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-d] pirimidin-2,4-diona; D) 5-butil-7-etil-1,3-dimetil pirido[2,3-d] pirimidin-2,4-diona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .



**Figura 3.** Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas sobre MCF-7. A) 5-fenil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; B) 7-etil-5-fenil-1,3-dimetil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; C) 5-butil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; D) 5-butil-7-etil-1,3-dimetil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .





**Figura 4. Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas sobre SW-480.** A) 5-fenil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; B) 7-etil-5-fenil-1,3-dimetil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; C) 5-butil-1,3-dimetil-7-propil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona; D) 5-butil-7-etil-1,3-dimetil pirido[2,3-*d*] pirimidin-2,4-diona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .

En la tabla 8 se presentan las  $CI_{50}$  de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas evaluadas, las piridopirimidinas III (**PBuPro**) y IV (**PBuEt**) presentaron menor actividad con respecto a los fármacos controles, los cuales fueron cis-platino (HeLa), doxorubicina (MCF-7) y 5-fluorouracilo (SW-480). La  $CI_{50}$  determinada para los compuestos III y IV fue mayor que la que presentaron los fármacos utilizados como controles. En las 3 líneas celulares se observó el mismo comportamiento a las 24, 48 y 72 horas de exposición, ya que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los distintos tiempos evaluados.

Línea celular HeLa			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
I. PPhPro	NC	NC	NC
II. PPhEt	NC	NC	NC
III. PBuPro	260.0 $\pm$ 127.3	377.1 $\pm$ 211.9	159.5 $\pm$ 20.5
IV. PBuEt	463.2 $\pm$ 145.9	381.5 $\pm$ 97.2	191.8 $\pm$ 60.0
Cis-platino	13.15 $\pm$ 0.12	8.35 $\pm$ 1.18	8.4 $\pm$ 1.55
Línea celular MCF-7			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
I. PPhPro	NC	NC	NC
II. PPhEt	NC	NC	NC
III. PBuPro	NC	642.6 $\pm$ 14.6	660.0 $\pm$ 38.3
IV. PBuEt	355.0 $\pm$ 188.3	490.4 $\pm$ 88.02	268.9 $\pm$ 101.7
doxorubicina	2.5 $\pm$ 0.48	0.595 $\pm$ 0.28	0.66 $\pm$ 0.32
Línea celular SW-480			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
I. PPhPro	NC	NC	NC
II. PPhEt	NC	NC	NC
III. PBuPro	323.7 $\pm$ 174.4	443.7 $\pm$ 24.3	269.5 $\pm$ 134.9
IV. PBuEt	471.5 $\pm$ 146.3	497.8 $\pm$ 96.1	321.5 $\pm$ 41.5
5-fluorouracilo	371 $\pm$ 127.2	180.5 $\pm$ 44.4	134.3 $\pm$ 29.9

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias 50 ( $CI_{50}$ ) de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas en HeLa, MCF-7 y SW-480. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES. NC: *No citotóxico*.

Al comparar la respuesta de las piridopirimidinas III y IV entre las 3 líneas celulares de cáncer, se observa que el compuesto III (**PBuPro**) presentó una menor actividad en MCF-7 con respecto a HeLa y SW-480. Sin embargo, en el caso del compuesto IV (**PBuEt**) no se observa ninguna diferencia estadísticamente significativa (Figura 20).

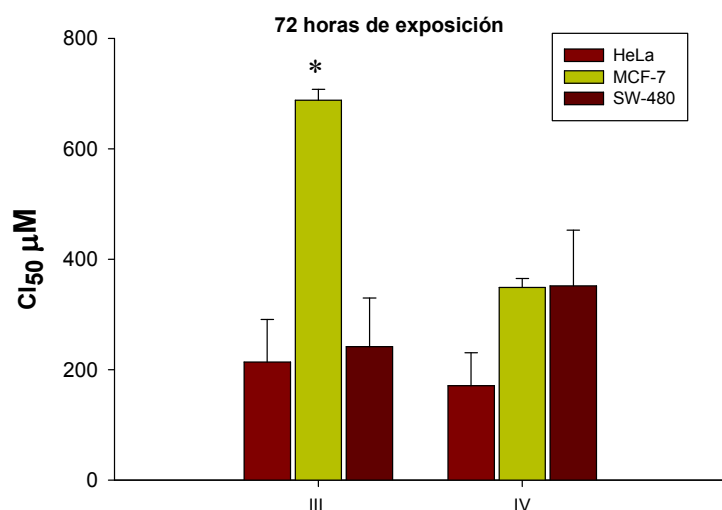


Figura 5. Actividad de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas III y IV en 3 líneas celulares de cáncer a las 72 horas de exposición. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES.

\*Grupos significativos,  $p \leq 0.05$  mediante un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

Comparando la respuesta entre las piridopirimidinas III y IV; en la figura 21 se muestra que la  $CI_{50}$  para el compuesto IV es significativamente menor en MCF-7 con respecto al compuesto III; sin embargo, en el caso de HeLa y SW-480, no se observa ninguna diferencia estadística entre estas dos moléculas.

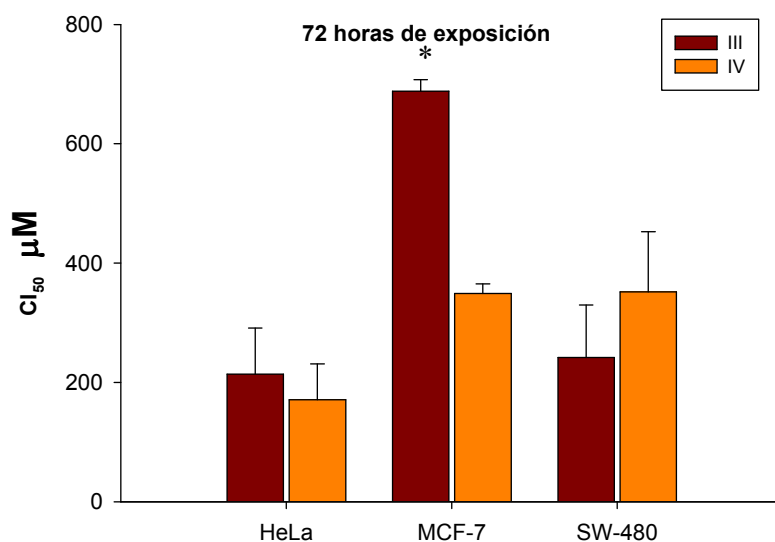


Figura 6. Diferencias entre las las pirido[2,3-*d*]pirimidinas III y IV a las 72 horas de exposición en 3 líneas celulares de cáncer. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES.

\*Grupos significativos,  $p \leq 0.05$  mediante un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

Los antecedentes muestran que moléculas análogas de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas presentan una actividad citotóxica importante. Sin embargo, nuestro trabajo demuestra que cuando tienen un grupo fenilo en la posición 5, no se observa ningún cambio en la viabilidad celular sobre las líneas celulares evaluadas. Sin embargo, al estar sustituidas con un grupo butilo en la posición 5 presentan citotoxicidad en las tres líneas celulares. Este efecto posiblemente se debe a la hidrofobicidad que le confiere las cadenas hidrocarbonadas del butilo a su estructura molecular y lo cual le permitiría una mayor permeabilidad en la membrana celular.

En nuestros resultados se esperaba que la citotoxicidad se incrementara con respecto al tiempo; sin embargo, no se observó una disminución de la  $CI_{50}$  a las 48 y 72 horas posiblemente debido a la inestabilidad de los compuestos, provocando una reducción en el tiempo de exposición de los mismos sobre las células (Li Di & Kerns, 2006).

La  $CI_{50}$  reportada en la literatura de las pirido[2,3-*d*]pirimidinas que presentan actividad como inhibidores TK, de CDK o como inductores de apoptosis es menor a 1  $\mu$ M; sin embargo, en nuestros resultados sólo dos de las cuatro piridopirimidinas evaluadas presentaron un efecto citotóxico a partir de una concentración de 100  $\mu$ M. Este efecto observado a concentraciones relativamente altas probablemente se debe a las diferencias estructurales que se mencionan a continuación: un grupo amino en la posición 2 del anillo piridopirimidínico; enlace a un átomo electronegativo como azufre (-SH-), oxígeno (-O-, =O) o nitrógeno (-NH-) en la posición 7; y sólo tienen cadenas alifáticas de 1 o 2 carbonos o no están sustituidas en la posición 5.

Con los siguientes ejemplos se resalta la importancia sobre la actividad biológica de las diferentes características estructurales.

- ✓ **Grupo amino en la posición 2.** En los inhibidores de DHRF, el grupo amino aumenta la afinidad por la enzima. Para los inhibidores de CDKs, un estudio por medio de cristalografía con rayos-X (Barvian, 2000) ha confirmado que en el caso de CDK2 hay mayor afinidad por las piridopirimidinas que por el ATP; esto se da por la unión de un residuo de leucina (Leu<sup>83</sup>) con el nitrógeno de la posición 2.
- ✓ **Unión a un átomo electronegativo en la posición 7.** Esta característica se presenta en moléculas como los antifolatos que tienen un grupo sulfhidrilo (-

SH); en inhibidores de TK que presentan un oxhidrilo (-OH); y en inhibidores de CDK con un grupo amino (-NH). Los estudios de cristalografía indican que por interacciones de Van der Waals, el grupo amino se une a residuos de aspartato (Asp<sup>145</sup>) en la CDK2 (Barvian y col., 2000).

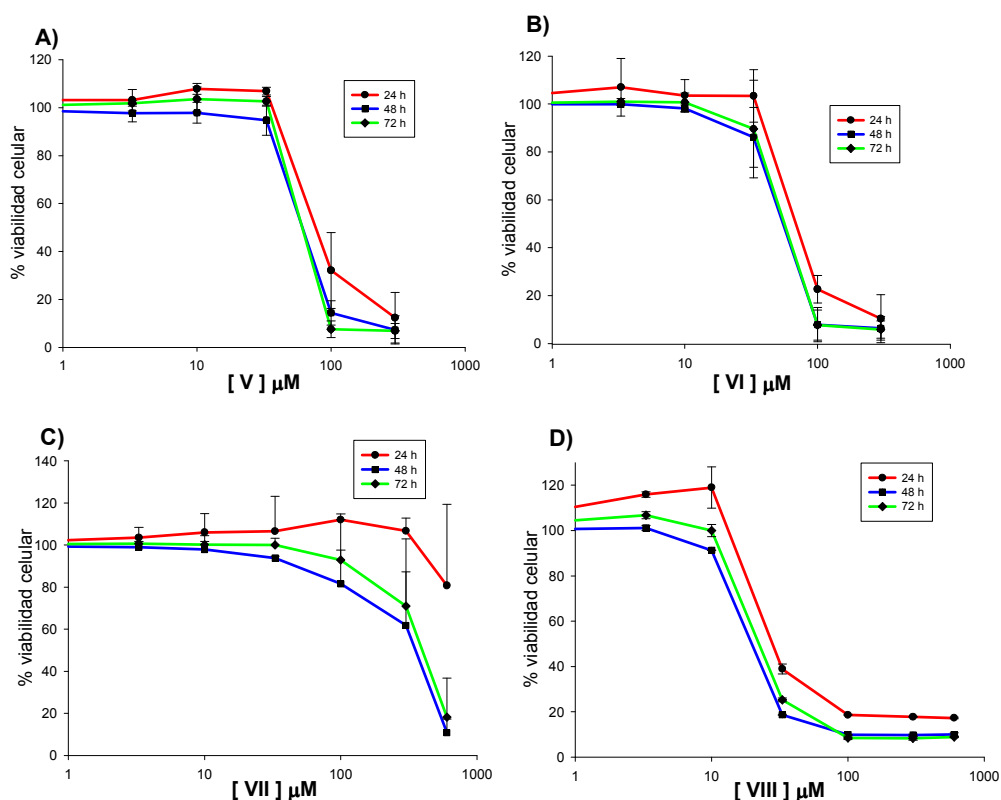
- ✓ **Sustitución con alquilos y no fenilos en la posición 5.** Los estudios SAR realizados por Connolly y Hamby en 1997, han demostrado que el grupo fenilo confiere mayor actividad al anillo piridopirimidínico si está sustituido con halógenos (bromo o cloro) en la posición 2,6; o con grupos alcoxi en la posición 3,5. Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas evaluadas en este trabajo, presentan un grupo fenilo en la posición 5 (el cual no tiene sustituyentes) y carece del grupo amino en la posición 2 y del grupo oxhidrilo, sulfhidrilo o amino en la posición 7. Así que sus  $Cl_{50}$  mayores a 100 $\mu$ M son consecuencia de las diferencias estructurales mencionadas anteriormente.

Sin embargo, se debe considerar que estos compuestos deben ser evaluados en un número mayor de líneas celulares de diferente origen, para confirmar o descartar sus propiedades como posibles agentes antineoplásicos.

## 5.4 Resultados de la evaluación citotóxica de $\alpha$ -alquinilcetonas.

Se evaluó el efecto citotóxico de las  $\alpha$ -alquinilcetonas en células HeLa y se determinó su  $CI_{50}$  a partir de curvas dosis-respuesta, en las cuales se observa una disminución del porcentaje de viabilidad celular (figura 22).

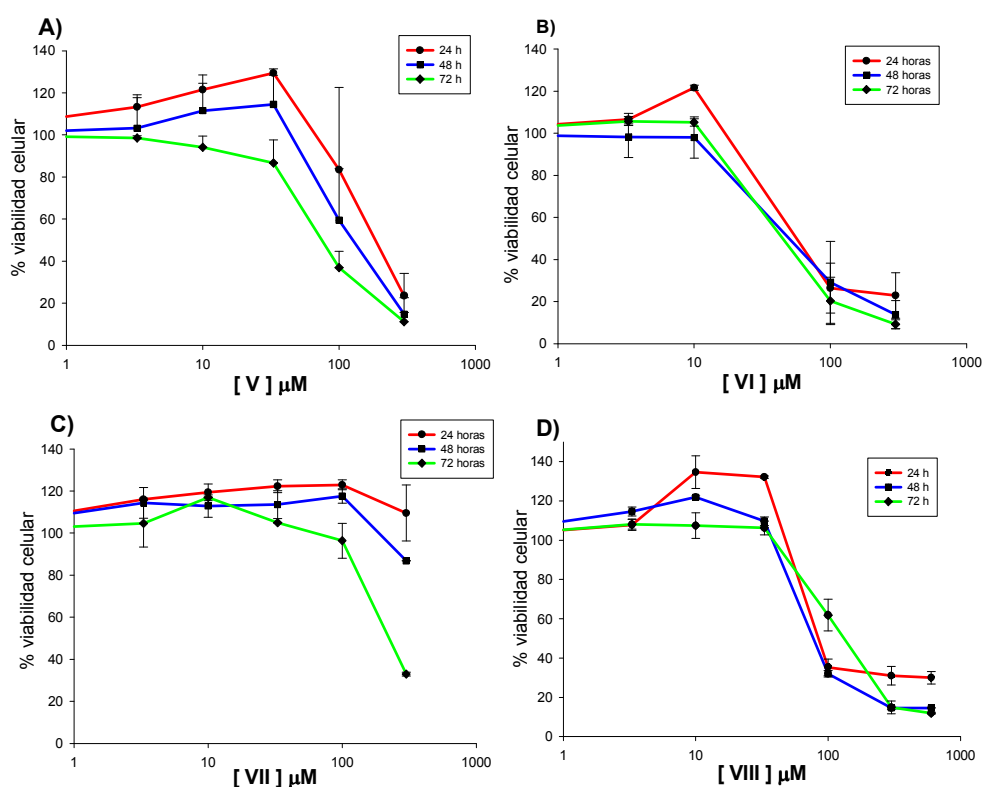
Las alquinilcetonas V y VI presentaron un efecto citotóxico a partir de 33  $\mu$ M; para los compuestos VII y VIII el mismo efecto se observó a partir de 100  $\mu$ M y 10  $\mu$ M respectivamente. Los compuestos V, VI y VIII, no mostraron diferencias en la viabilidad celular con respecto al tiempo de exposición (24, 48 y 72 horas); a diferencia de la  $\alpha$ -alquinilcetona VII (fig. 21-C) que presentó mayor actividad a 48 y 72 horas.



**Figura 7.** Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de  $\alpha$ -alquinilcetonas sobre HeLa. A) 3-ferrocenil-1-(2-metilfenil)-2-propinona; B) 3-ferrocenil-1-(3-metilfenil)-2-propinona; C) 3-ferrocenil-1-(4-metilfenil)-2-propinona; D) 1,3-difenil-2-propinona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .

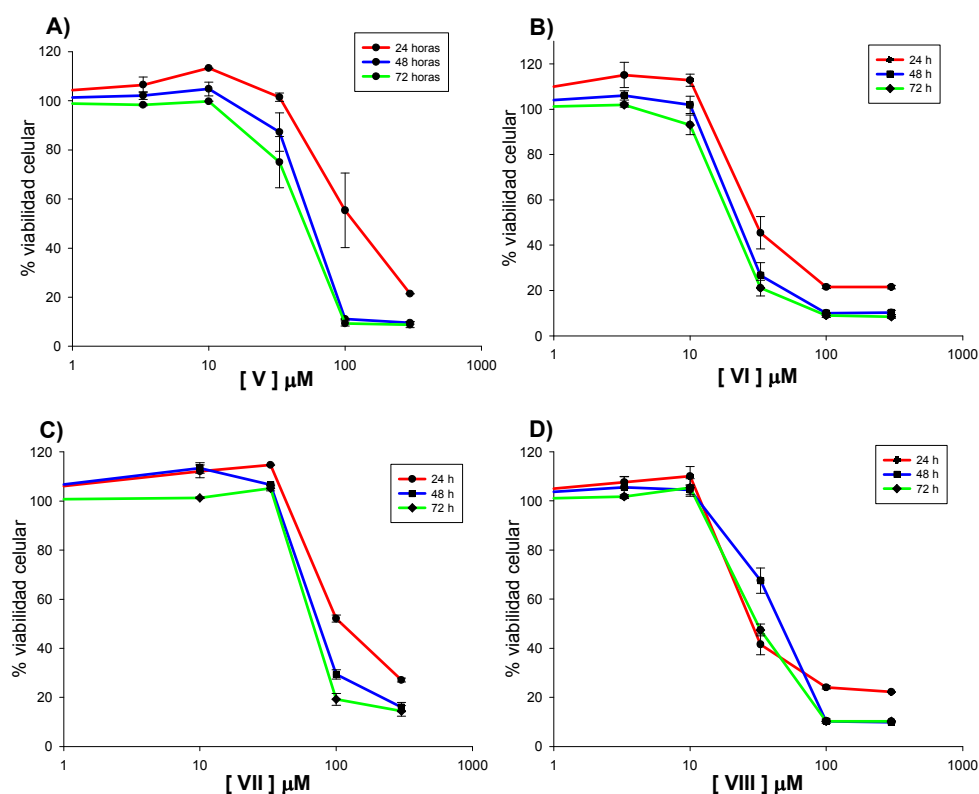
La evaluación citotóxica de los compuestos del V al VIII sobre células MCF-7 se muestran en la figura 23. Las  $\alpha$ -alquinilcetonas V y VIII disminuyen el porcentaje de viabilidad celular a partir de 33  $\mu$ M, mientras que para los compuestos VI y VII se observa un efecto citotóxico a partir de 100 y 10  $\mu$ M, respectivamente.

El efecto citotóxico fue independiente del tiempo de exposición para los compuestos V, VI y VIII; a diferencia de la  $\alpha$ -alquinilcetona VII la cual presentó mayor citotoxicidad a 72 horas que a 24 y 48 horas.



**Figura 8. Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de  $\alpha$ -alquinilcetonas sobre MCF-7.** A) 3-ferrocenil-1-(2-metilfenil)-2-propinona; B) 3-ferrocenil-1-(3-metilfenil)-2-propinona; C) 3-ferrocenil-1-(4-metilfenil)-2-propinona; D) 1,3-difenil-2-propinona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .

La citotoxicidad de  $\alpha$ -alquinilcetonas en la línea celular de cáncer de colon (SW-480) se muestra en la figura 24. Los compuestos V y VII presentaron un mayor efecto citotóxico a partir de una concentración de 33  $\mu\text{M}$ , y para las  $\alpha$ -alquinilcetonas VI y VIII se observó el mismo efecto a partir de 10  $\mu\text{M}$ . En la figura 23-A, B y C, se observa que existe mayor actividad a 48 y 72 horas que a 24 horas de exposición.



**Figura 9. Curvas dosis-respuesta del efecto citotóxico de  $\alpha$ -alquinilcetonas sobre SW-480.** A) 3-ferrocenil-1-(2-metilfenil)-2-propinona; B) 3-ferrocenil-1-(3-metilfenil)-2-propinona; C) 3-ferrocenil-1-(4-metilfenil)-2-propinona; D) 1,3-difenil-2-propinona. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm ES$ .



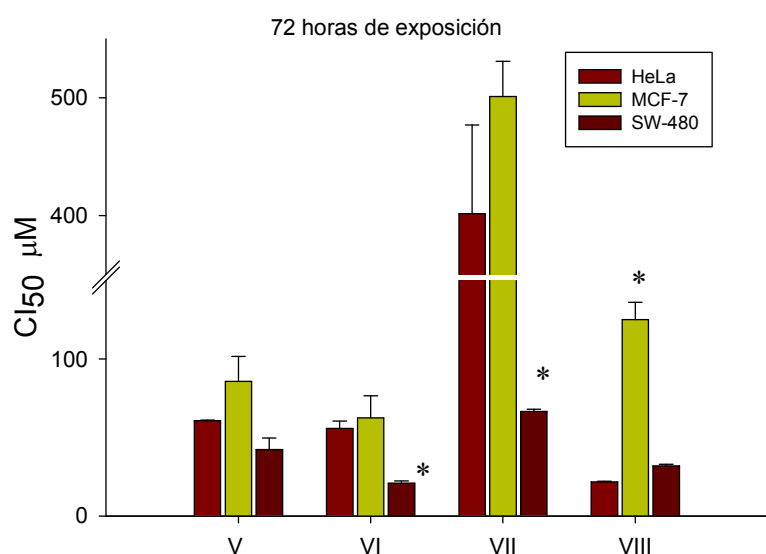
Las  $CI_{50}$  determinadas de la evaluación de las  $\alpha$ -alquinilcetonas se muestran en la tabla 9, se observa que el compuesto VII (**AFcpMePh**) no presentó actividad citotóxica a las 24 horas en HeLa, ni a las 24 y 48 horas en MCF-7. Sin embargo las alquinilcetonas V (**AFcoMePh**), VI (**AFcmMePh**) y VIII (**APhPh**), presentaron citotoxicidad sobre las tres líneas celulares aunque no existió diferencia significativa con respecto al tiempo de exposición.

Las  $\alpha$ -alquinilcetonas presentan una  $CI_{50}$  mayor en comparación con cisplatino (control positivo en HeLa) y doxorubicina (control positivo en MCF-7). Sin embargo, la actividad de las  $\alpha$ -alquinilcetonas comparadas con 5-fluorouracilo (control positivo en SW-480) fue mayor. El compuesto VI presentó la menor  $CI_{50}$  en SW-480, por lo que se le considera el compuesto más citotóxico; al comparar esta alquinilcetona con 5-fluorouracilo, resultó alrededor de 10, 7 y 6 veces con mayor actividad a 24, 48 y 72 horas, respectivamente (ver tabla 9).

Línea celular: HeLa			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
V. AFcoMePh	90.8 $\pm$ 13.5	61.06 $\pm$ 3.15	60.65 $\pm$ 0.39
VI. AFcmMePh	68.26 $\pm$ 4.06	54.7 $\pm$ 3.6	55.75 $\pm$ 4.69
VII. AFcpMePh	NC	346.35 $\pm$ 69.48	401.6 $\pm$ 75.3
VIII. APhPh	26.95 $\pm$ 0.85	18.44 $\pm$ .048	21.01 $\pm$ 0.89
cisplatino	17.15 $\pm$ 2.91	8.07 $\pm$ 1.05	8.34 $\pm$ 1.54
Línea celular: MCF-7			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
V. AFcoMePh	158.5 $\pm$ 52.09	142.6 $\pm$ 37.87	85.72 $\pm$ 15.8
VI. AFcmMePh	122.5 $\pm$ 25.4	80.05 $\pm$ 16.75	62.45 $\pm$ 14.02
VII. AFcpMePh	NC	NC	501.05 $\pm$ 29.9
VIII. APhPh	81.5 $\pm$ 2.95	74.7 $\pm$ 1.28	125 $\pm$ 17.1
doxorubicina	3.02 $\pm$ 0.41	0.49 $\pm$ 0.15	0.76 $\pm$ 0.35
Línea celular: SW-480			
Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 24 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 48 h	$CI_{50}$ ( $\mu$ M) a 72 h
V. AFcoMePh	69.53 $\pm$ 3.17	55.36 $\pm$ 4.26	42.3 $\pm$ 7.18
VI. AFcmMePh	32.17 $\pm$ 6.95	23.4 $\pm$ 2.43	20.8 $\pm$ 1.44
VII. AFcpMePh	100.5 $\pm$ 0.32	72.55 $\pm$ 1.46	66.1 $\pm$ 1.4
VIII. APhPh	28.1 $\pm$ 2.04	44.35 $\pm$ 3.3	31.4 $\pm$ 1.3
5-fluorouracilo	371 $\pm$ 127.2	180.5 $\pm$ 44.4	134.3 $\pm$ 29.9

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias 50 ( $CI_{50}$ ) de las  $\alpha$ -alquinilcetonas en HeLa, MCF-7 y SW-480. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES. NC: No citotóxico.

La selectividad de las  $\alpha$ -alquinilcetonas sobre las tres líneas celulares de cáncer se puede ver en la figura 25; a las 72 horas de exposición se observó que las moléculas VI y VII (**AfcmMePh** y **AfcpMePh**) presentaron mayor actividad en la línea celular de cáncer de colon (SW-480); la ferrocenilcetona con el grupo *o*-toluilo en la posición 1 (compuesto V **AfcoMePh**), no presentó diferencia significativa al comparar su actividad entre las 3 líneas celulares. La alquinilcetona VIII (**AphPh**), (que no presenta el grupo ferrocenilo en su estructura) mostró mayor actividad tanto en SW-80 como en HeLa.



**Figura 10.** Actividad de  $\alpha$ -alquinilcetonas en 3 líneas celulares de cáncer a las 72 horas de exposición. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES. \*Grupos significativos,  $p \leq 0.03$  mediante un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

La comparación de la citotoxicidad entre las  $\alpha$ -alquinilcetonas a las 72 horas de exposición se presenta en la figura 26. El compuesto VII (**AfcpMePh**) presentó la mayor CI<sub>50</sub> en las tres líneas celulares de cáncer, por lo que se le considera la alquinilcetona con menor citotoxicidad. Tanto en SW-480 como en MCF-7, no se observó diferencia significativa entre las ferrocenilcetonas (V y VI) y la alquinilcetona VIII. En células HeLa la alquinilcetona VIII presentó un mayor efecto citotóxico el cual fue estadísticamente significativo.

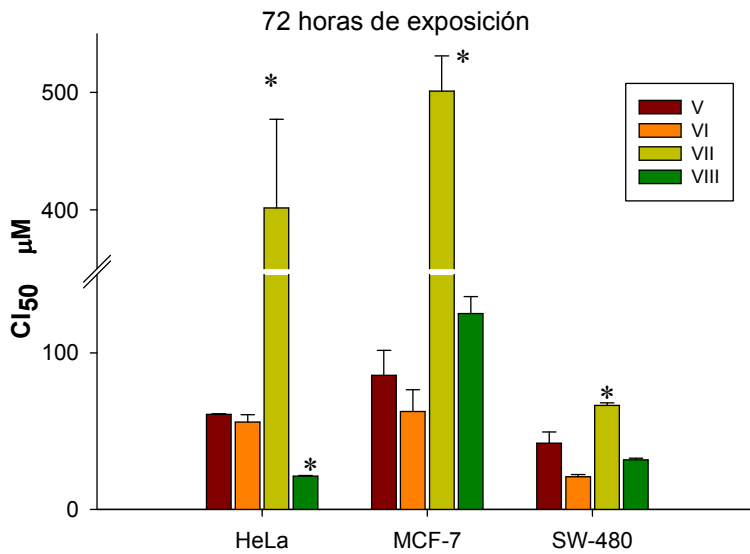


Figura 11. Diferencias entre las  $\alpha$ -alquinilcetonas, a las 72 horas de exposición en 3 líneas celulares de cáncer. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES. \*Grupos significativos,  $p \leq 0.05$  mediante un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

En la figura 27, se presenta la comparación de las  $CI_{50}$  de las  $\alpha$ -alquinilcetonas (V-VIII) sobre la línea celular SW-480. Los compuestos V, VI, VII y el fármaco control, presentaron una disminución de la  $CI_{50}$  en relación directa al tiempo de exposición (24, 48 y 72 h). El compuesto VIII tiene mayor actividad a 48 horas que a 24 y 72 horas, probablemente debido a una inestabilidad del compuesto.

Por otra parte los compuestos que presentan mayor actividad citotóxica fueron el VI y el VIII presentando una  $CI_{50}$  10 veces menor que el fármaco control (5-fluorouracilo).

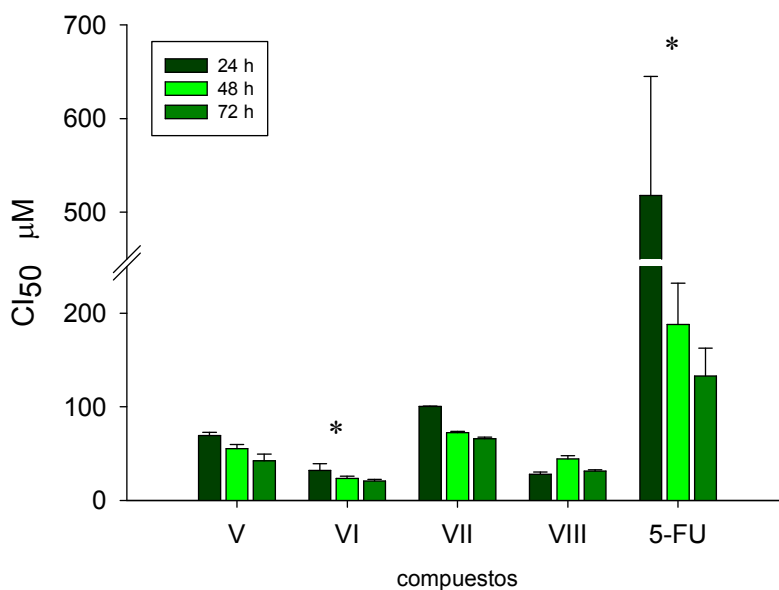


Figura 12. Comparación entre las  $\alpha$ -alquinilcetonas con respecto al tiempo en SW-480. Los datos representan el promedio de  $n=4 \pm$  ES. \*Grupos significativos,  $p \leq 0.05$  mediante un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

El mecanismo que se propone para explicar el efecto citotóxico de las  $\alpha$ -alquinilcetonas observado en las líneas celulares es la posible producción de radicales libres, principalmente oxhidrilo, por la oxidación del átomo de hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ) del grupo ferrocenilo (Osella y col., 2000). Sin embargo, las  $\alpha$ -alquinilcetonas sin el grupo ferrocenilo también presentaron actividad, posiblemente debido a que estas moléculas son planas y probablemente puedan intercalarse, por sí solas en la molécula de ADN; característica que presentan algunos quimio-terapéuticos como doxorubicina (González y col., 1998).

No existen reportes sobre la actividad biológica de este tipo de compuestos, sin embargo existe un estudio QSAR (Quantitative Structure Analysis Research) en el cual evalúan ferrocenilchalconas, cuya estructura es muy similar a las ferrocenilcetonas. En dicho estudio se determinó que este tipo de compuestos tienen actividad antimalárica y el ferroceno le confiere a la molécula propiedades oxido-reductoras, con lo cual aumentan su actividad biológica (Wu y col., 2006).

Se observó que la orientación **para** en el toluilo sustituido en la posición 1 de las  $\alpha$ -alquinilcetonas disminuye significativamente la actividad de estas. Lo cual se puede deber a efectos electronegativos, ya que el carbonilo es un grupo electroattractor que funciona como desactivante en reacciones de sustitución electrofílica aromática y es mayoritariamente regioselectivo en la posición **meta** (alrededor del 72%), a diferencia de la posición **para** donde el rendimiento es menor (alrededor del 9%).

Los compuestos con sustitución en **para** tienen una energía de activación mayor que aquellos con sustitución en **meta**, estos últimos hacen más factible las reacciones donde el ataque se deba por moléculas electrofílicas. Sin embargo, por el tipo de sustitución, el *p*-toluilo es menos estable que el *m*-toluilo.

Las  $\alpha$ -alquinilcetonas evaluadas no tuvieron diferencia significativa con respecto a los controles utilizados en HeLa y MCF-7, con excepción de la línea celular SW-480 donde el 5-fluorouracilo resultó entre 6 y 10 veces menos activo que las  $\alpha$ -alquinilcetonas.

En el ámbito clínico el 5-fluorouracilo sigue siendo el fármaco con mejor respuesta en el tratamiento de cáncer de colon (Block, 1982). La selectividad que mostraron las  $\alpha$ -alquinilcetonas sobre la línea celular SW-480 indica que pueden considerarse como moléculas con probable efectividad en el tratamiento de este tipo

de cáncer. Pues estos compuestos presentan hasta un 90% mayor inhibición que el fármaco control.

Dichos compuestos resultaron más activos en la línea celular de cáncer de colon que en el 75% de los casos, tiene una mutación en el cromosoma 17 que codifica para una proteína p53 deficiente (Rochette y col., 2005), a diferencia de la línea de cáncer de cervix (HeLa) en la cual la displasia es provocada por el virus del papiloma humano (VPH subtipo 18) (López & Lízano, 2006); y de la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) la cual presenta receptores dependientes a estrógenos.

Estos resultados demuestran que estas moléculas tienen actividad citotóxica por lo que vale la pena ampliar la selección con mayor número de compuestos y realizar estudios de relación estructura-actividad (SAR); además de elucidar su mecanismo de acción.

## 6. CONCLUSIONES

Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas I y II, sustituidas en la posición 5 con un fenilo, no presentan (hasta 700  $\mu\text{M}$ ) un efecto citotóxico sobre HeLa, MCF-7 y SW-480.

Las pirido[2,3-*d*]pirimidinas III y IV, sustituidas en la posición 5 con un butilo, presentan una  $\text{CI}_{50}$  mayor de 100  $\mu\text{M}$  en las tres líneas celulares de cáncer.

Las  $\alpha$ -alquinilcetonas presentaron mayor citotoxicidad y una  $\text{CI}_{50} \leq 100 \mu\text{M}$  en la línea celular de cáncer de colon (SW-480).

La ferrocenilcetona sustituida en la posición 1 con un grupo *p*-toluilo (VII) presenta menor citotoxicidad que las ferrocenilcetonas V y VI, sustituidas con *o*-toluilo y *m*-toluilo, respectivamente.

El grupo ferrocenilo en la posición 3 no tiene una influencia significativa sobre el efecto citotóxico de las  $\alpha$ -alquinilcetonas.

## 7. PERSPECTIVAS

Se propone realizar una selección en otras líneas celulares, para determinar si existe especificidad por algún tipo de células cancerosas y descartar la toxicidad en células normales.

Es importante evaluar compuestos variando los sustituyentes tanto en el anillo pirido[2,3-*d*]pirimidínico como en  $\alpha$ -alquinilcetonas.

Evaluar el efecto antitumoral in vivo de las  $\alpha$ -alquinilcetonas, con y sin ferroceno.

Determinar el mecanismo por el cual las  $\alpha$ -alquinilcetonas tienen un efecto citotóxico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abeloff, M. D.; Armitage, J.O.; Niederhuber, J.E.; *Oncología Clínica*, 3a. Ed, editorial Elsevier, España, **2005**
- Aldeco, A; Álvarez, C; Toscano, A; García, G; Penieres, G; *Tetrahedron Letters* 49, **2008** 2942–2945
- Al-Obeidi, A; Lam, K; *Oncogene*, **2000**, 19, 5690 – 5701
- Arellano, I; "Síntesis y pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatorio y citotóxica de 1,3-dimetilpirido[2,3-d]imidin-2,4-dionas-5,7-disustituidas"; FES Zaragoza, UNAM, México, D.F., **2004**
- Arellano, I; Sharma, P; Arias, J.L.; Toscano, A; Cabrera, A; Rosas, N; *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2007**, 266, 294–299
- Arzoumanian, H; Jean, M; Nuel, D; Cabrera, A; García-Gutierrez, J; Rosas, N; *Organometallics*, **1995**, 14, 5438-5441
- Arzoumanian, H; Jean, M; Nuel, D; García, J; Rosas, N; *Organometallics*, **1997**, 16, 2726.
- Avendaño, C.; "Introducción a la química farmacéutica", Mc Graw Hill, 2a. ed, España, **2001**
- Bagley, M; Hughes, D; Lloyd, R; Powers, V; *Tetrahedron Letters* 42, **2001**, 6585–6588
- Barvian, M.; Boschelli, D.H.; Cossrow, J.; Dobrusin, E.; Fattaey, E.; Fritsch, A.; Fry, D.; Pyrido[2,3-d] pyrimidin-7-one Inhibitors of Cyclin- Dependent Kinases *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4606-4616
- Bhattachar, S; Deschenes, L.A.; Wesley, J; *Drug Discovery Today*, 11, **2006**, 1012-1018
- Bincoletto, C; Tersariol, I; Oliveira, C; Dreher, S; Fausto, DM.; Soufen M A; Nascimento F D; Caires A; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, **2005**, 3047–3055
- Block, J. B.; "Oncology"; Wiley & Sons, Inc, USA, **1982**
- Bondy, S; Watkins, W J; Chong, L; Herdewijn, M; Jonghe, S; Patente WO2008077650 de Gilead Sciences INC, "Pyrido(3,2-d)pyrimidines useful for treating viral infections", **2008**
- Budman, D.F.; Calvert, A.H.; Rowinsky, E.K.; "Handbook of Anticancer Drug Development", 1a. Ed; Editorial Williams & Wilkins, USA, **2003**, 25-129
- Casas, J; Castaño, M; Cifuentes, M; Garcia-Monteagudo, J; Sanchez, A; Sordo, J; Abram, U; *Journal of Inorganic Biochemistry* 98, **2004**, 1009–1016
- Connolly, C; Hamby, J; Schroeder, M; Barvian, M; Lu, G; Panek, R; Amar, A; Shen, C; Kraker, A; Fry, D; Klohs, W; Doherty, A; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **1997**, 7, 18, 2415-2420
- Cordeu, L.; Cubedo, E.; Bandre, E.; Rebollo, E.; Saénz, X.; Chozas, H.; Domínguez, M. V.; Echeverría, M.; Mendivil, B.; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2007**, 15, 1659–1669
- Dorsey, J.A.; Jove, R; Kraker, A; Wu, J; *Cancer Research*, **2000**, 60, 3127–3131,
- Degraw, J; *J. Med. Chemistry*; **1974**, vol. 17, 4, 470-471
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, SSA; México, D.F.; 8ª ed., 1, **2004**
- Florez, J.; "Farmacología humana", 4a ed, Masson; España, **2003**
- García, N.I.; (Licenciatura) "Síntesis catalítica con níquel en medio acuoso y pruebas de actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica de  $\gamma$ -lactamas y pridopirimidinas sustituidas", FES-Zaragoza, UNAM, México, D.F. **2005**

González, M; Ordoñez, A; Feliu, J; Zamora, P; Espinosa, E; "Oncología clínica, fundamentos y patología general, McGraw Hill, Interamericana, 2a ed, **1998**

Grivsky, E. M.; Lee, S.; Sigel, W.; Duch, D.; Nichol, C. N.; J. Med. Chem., **1980**, 23, 327-329

Hamby, J. H.; Connolly, C; Schroeder, M. C.; Winters, T.; Showalter, H; J. Med. Chem. **1997**, 40, 2296-2300

Hardman, J.G.; Goodman, A.; Limbird, L.E.; "Las bases farmacológicas de la terapéutica", McGraw Hill, Interamericana, 9ª ed.; **1996**

Hashimoto, O.; Shinkawa, M.; Torimura, T.; Nakamura, T.; Selvendiran, K.; Sakamoto, M.; Koga, H.; BMC Cancer **2006**, 6, 292, 1-11

INEGI; <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2008/cancer08.pdf> (05/03/**2008**)

Juxing, Y; Siaojun, W; Yongmin, L; Xiaoli, W; Baohua, C; Yongxiang, M; Synthesis, **2004**, 3,331-333

Korivi, R; Cheng, Ch; Journal Org. Chem. **2006**, 71, 7079-7082

Kowalski, K; Zakrzewski, J; Long, N; Suwaki, N; Mann, D; White, A; Dalton Trans., **2006**, 571–576

Kumar, V; Abbas, A; Fausto, N; "Robins & Cotran, Patología estructural y funcional", El sevier, 7 ed, España, **2005**, 273

Kumar, N; Singh, G; Yadav, A; Heteroatom Chemistry, **2001**, 12, 52–56.

Li Di & Kerns, E.H.; Drug Discovery Today, 11, **2006**, 446-451

López & Lizano, Cancerología, SSA; 1, **2006**, 31-55

Matsumoto, J. & Minami, S.; Journal of Medicinal Chemistry, **1975**, Vol. 18, No. 1

Nam, G; Min Yoon, Ch; Kim, E; Rhee, Ch; Kim, J; Shin, J. H.; Kim, S; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 11, **2001**, 611-614

Nelson, D; Cox, M; "Lenhinger, Principles of biochemistry", 4a. ed, Freeman and company, New York, **2005**.

Nelson M, Dolder C, Ann Pharmacotherapy, **2006**, 40, 2, 261-9

Nguyen, A; Marsaud, V; Bouclier, C; Top, S; Vessieres, A; Pigeon, P; Gref, R; Legrand, P; Jaouen, G;Renoir, J; International Journal of Pharmaceutics 347, **2008**,128–135

OMS; <http://www.who.int/cancer/en/> (10/03/**2008**)

Osella, D; Ferrali, M; Zanello, P; Laschi, F; Fontani, M; Nervi, C; Cavigliolo, G; Inorganica Chimica Acta 306, **2000**, 42–48

Pelengaris, S; Khan, M; "The molecular biology of cancer"; Blackwell Publishing, USA, **2006**

Perry, M.C.;"The chemotherapy sourcebook", 1a ed, editorial Williams & Wilkins, USA **1992**, 1, 2-64

Petty, T; Journal of Clinical Oncology, **2003**, 1, 17, 3–4.

Poelhsitz G V; Bogado, A.L.; Peres, M; Selistre, H.S.; Ellena, J; Castellano, E; Azevedo, A; Polyhedron, **2007**, 26, 4707–4712

Ragab, N; Mohamed, M; Mahmoud, Y; Elnagdi, M; Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, **2007**, 6227–6235

Rochette, P.J.; Bastien, N; Lavoie, J; Guerin, S; Drouin, R; J. Mol. Biol., **2005**, 352, 44–57



Rosas, N; Sharma, P; Álvarez, C; Gómez, E; Gutiérrez, Y; Méndez, M; Toscano, R; Maldonado, L; Tetrahedron lett, **2003**, 44, 8019-8022

Rosas, N; Sharma, P; Cabrera, A; Pénieres, G; Heterocycles, **2001**, 1, 2341

Rosas, N; Sharma, P; Cabrera, A; Pénieres, G; García, J; Maldonado, L; Heterocycles, **2003**, 60, 2631

Sielecki, T; Boylan, J; Benfield, P; Trainor, G; Journal of Medicinal Chemistry, **2000**, 43, 1,1-18

Tohda, Y; Sonogashira, K; Hagihara, N; Synthesis, **1977**, 777-778

Top, S; Vessières, A; Cabestaing, C; Laios, I; Leclercq, B; Provot, C; Jaouen, G; Journal of Organometallic Chemistry 637–639, **2001**, 500–506

Tu, S.; Zhang, J.; Zhu, X.; Xu, J.; Zang, Y.; Wang, Q.; Jia, R.; Jiang, B.; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16, **2006**, 3578–3581

Vessières, A; Top, S; Beck, W; Hillard, E; Jaouen, G; Dalton Trans., **2006**, 529–541

Wedge, S.; Kendrew, J.; Hennequin, L.; Cancer Res, **2005**, 65 (10): 4389–4400

Woo, J; Hwan Lee, B; Jin Cho, J; Jung, J; Hwang, J; Min Yoon, Ch; Tetrahedron Letters 41, **2000**, 5899-5902

Wu, X; Tiekink, E; Kostetski, I; Kocherginsky, N; Tan, A; Khoo, S; Wilairat, P; Go, M; European journal of pharmaceutical sciences 27, **2006**, 175–187

Zhou, Y; Li, S; Hu, Y; Wang, J; Hauser, J; Conway, J; Vinci, M; Humphrey, L; Zborowska, E; Willson, J; Brattain, J; Cancer Research, **2006**; 66, 404-411