



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FRAGMENTACIÓN DE DNA POR
NUEVOS DERIVADOS DE TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA EN
LÍNEAS CELULARES HUMANAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

SERGIO IVAN MOLINA REYES



MÉXICO, D.F.

2012



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: ATONATIUH EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ

VOCAL: Profesor: CARLOS PÉREZ MUÑOZ

SECRETARIO: Profesor: JOSE DOLORES SOLANO BECERRA

1er. SUPLENTE: Profesor: MARIA ELENA IBARRA RUBIO

2° SUPLENTE: Profesor: MARIA EVA GONZÁLEZ TRUJANO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA. U.N.A.M. LABORATORIO B-202. BIOLOGÍA MOLECULAR E INVESTIGACIÓN EN CÁNCER

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ANGELINA QUINTERO R. (†) Y MEN C. JOSÉ DOLORES SOLANO BECERRA

SUSTENTANTE:

SERGIO IVAN MOLINA REYES

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS A DIOS POR COBIJARME CON SU INMENSO AMOR E IMPRIMIRME ESA FUERZA Y PERSEVERANCIA QUE A VECES NO SÉ DE DÓNDE PROVIENE, PERO AHÍ ESTÁ SIEMPRE.

A MIS PAPÁS JORGE (†) Y GLORIA POR TODO SU AMOR, APOYO E IMPULSO.

A MIS HERMANOS JORGE, LILI, JULIO, ALAN Y SOBRINOS AMIN, DALI, IAN, MADELEIN, POR TODO SU CARIÑO.

A LA DRA. ANGELINA QUINTERO (†) Y A JOSÉ POR SU AMISTAD, CONFIANZA, GUÍA, APOYO Y PACIENCIA EN TODO MOMENTO PARA LA REALIZACIÓN Y TÉRMINO DEL PRESENTE TRABAJO.

AL DR. ALFONSO LIRA QUE CON LA APORTACIÓN DE LOS COMPUESTOS EVALUADOS Y A LOS PROFESORES QUE CON SU REVISIÓN Y COMENTARIOS HICIERON POSIBLE Y ENRIQUECIERON ÉSTE ESCRITO.

A MIS AMIGOS, EN ESPECIAL A LA FUNDACIÓN GUILLERMO LINAGE OLGUÍN I.A.P. POR SU AMISTAD Y LA BECA ECONÓMICA PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS DE BACHILLERATO Y LICENCIATURA.

A EDGAR Y LA FAMILIA POSADAS POR SU GUÍA Y APOYO EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES, LO VALORO MUCHO.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA U.N.A.M, QUE COMO INSTITUCIÓN HE PODIDO COMPROBAR SU COMPROMISO EN LA FORMACIÓN DE PROFESIONALES EN EL ÁREA QUÍMICA DE GRAN CALIDAD Y VALOR PARA EL PAÍS, ES UN ORGULLO HABERME FORMADO AQUÍ.

CONTENIDO

CONTENIDO.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS	2
ABREVIATURAS.....	4
1.0 RESUMEN.....	7
ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FRAGMENTACIÓN DE ADN POR NUEVOS DERIVADOS DE TIAZOLO[5,4-b]QUINOLINA EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS.....	7
2.0 JUSTIFICACIÓN	8
3.0 ANTECEDENTES	9
3.1 CÁNCER	9
3.2 GENERALIDADES DEL CANCER	12
3.3 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER.....	15
3.3.1 Ciclo Celular.	15
3.3.2 Ciclinas	19
3.3.3 Diferencias entre células normales y células cancerosas.....	20
3.3.4 Alteraciones genéticas asociadas al cáncer	21
4.0 RESISTENCIA A FÁRMACOS	23
5.0 APOPTOSIS.....	25
6.0 ADN TOPOISOMERASAS Y EL CÁNCER	26
6.1 Inhibidores de la Topoisomerasa II.....	27
7.0 TERAPÉUTICA DE LAS LEUCEMIAS.	32
7.1 Quinolinas y la Leucemia.....	34
7.2 Agentes que Reaccionan con el ADN	37
8.0 HIPÓTESIS	43
9.0 OBJETIVOS	44
9.1 Objetivo General.....	44
9.2 Objetivos Específicos	44
10.0 MATERIAL Y MÉTODOS	45
10.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	45
10.1.1 Medio de Cultivo.....	45
10.1.2 Medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium by Invitrogene.	45
10.1.3 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS)	46
10.1.4 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos/Ácido Etilendiaminotetracético (PBS-EDTA)	46
10.1.5 Solución MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)	47
10.1.6 p- Formaldehído al 4%	47
10.2 Medios de Congelamiento	48
10.2.1 Medio I. Para líneas celulares : HeLa, CaLo, K-562, SW480 y SW620.....	48
10.2.2 Medio II. Para la línea celular : MCF-7.	48
11.0 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.....	49
12.0 Estructura química de los 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina evaluados.	50
13.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	51
13.1 PRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES	51
13.1.1 Material y soluciones:	51

13.2	CONTEO CELULAR.....	52
13.3	INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. REDUCCIÓN DEL MTT53	
13.4	DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN POR LA TÉCNICA DE TUNEL (TdT-MEDIATED dUTP NICK END LABELING).....	55
13.5	TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA.....	57
13.5.1	Morfología Celular	57
14.0	RESULTADOS	58
14.1	Evaluación de la actividad citotóxica mediante la técnica colorimétrica de MTT y determinación de la IC _{50%} para los compuestos I, II, III y IV en seis líneas celulares tumorales humanas.	58
14.2	ENSAYO DE TUNEL.....	64
14.3	MORFOLOGÍA CELULAR.....	67
14.4	Efecto en la morfología en células HeLa tratadas con el compuesto III.	68
15.0	DISCUSIÓN.....	71
16.0	CONCLUSIONES.....	76
17.0	BIBLIOGRAFIA.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Ciclinas presentes en mamíferos.	19
Tabla 2	Características de Diferentes Tipos de Muerte Celular	39
Tabla 3	Citotoxicidad (IC ₅₀ , μM) de los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares humanas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo en México, de acuerdo a estadísticas vitales 2002.INEGI.....	10
Figura 2	Paradigma toxicológico	14
Figura 3	Fases del Ciclo Celular.....	16
Figura 4	Modelo de una topoisomerasa II activa.....	27
Figura 5	Modelo molecular de intercalación del núcleo de acridina tri-sustituída enlazada a la región cuádruple de G-ADN.	28
Figura 6	Amsacrina; ejemplo de intercalador utilizado en el tratamiento contra la Leucemia.	28
Figura 7	Estructura de m-AMSA en comparación con el núcleo de acridina.....	29
Figura 8	Esquema de intercalación de acridina en la molécula del ADN	30
Figura 9	Esquema general de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis.....	42
Figura 10	Cámara de Neubauer.	53
Figura 11	Reacción de reducción del MTT.....	54
Figura 12	Porcentaje de inhibición de la proliferación de las líneas celulares.....	60
Figura 13	Porcentaje de inhibición de la proliferación de las líneas celulares.....	61

Figura 14	Valores de CI50% obtenidos en la prueba de reducción de MTT entre los cuatro derivados para cada una de las líneas celulares tumorales empleadas.....	63
Figura 15	Citotoxicidad del compuesto I, II, III y IV en las seis líneas celulares tumorales humanas	63
Figura 16	Tinción mediante técnica de TUNEL en línea celular HeLA.....	65
Figura 17	Tinción mediante la técnica de TUNEL en línea celular K-562.....	66
Figura 18	Apoptosis, esquema comparativo con la Necrosis.....	68
Figura 19	Tinción con Hematoxilina/Eosina.	70

ABREVIATURAS

ADN (DNA)	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
<i>Ser</i>	Gen que codifica para el aminoácido Serina
<i>Thr</i>	Gen que codifica para el aminoácido Treonina
Tyr	Aminoácido Tirosina
pb	Pares de bases
cbp	Cuanto baste para
CDKs	Ciclinas dependiente de cinasas
col.	Colaboradores
°C	Grados Celsius
DMSO	Dimetil sulfóxido
D-MEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco
cél.	Células
Ctrl	Control
CV	Coeficiente de variación
GC	Guanina-Citosina
h	Horas
HEPES	Ácido N(2-hidroxiethyl)piperazin N'-2(2-etanosulfónico)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria del 50 por ciento de

	la proliferación celular
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (México)
INK	Inhibidor de cinasas
E2F (1,2 y 3)	Factores de transcripción reguladores del ciclo celular.
Fig.	Figura
%HR	Porcentaje de Humedad Relativa
Máx.	Máximo
MCP	Muerte celular programada
mg	miligramos
min	Minutos
Mín.	Mínimo
mL	mililitros
mm	milímetros
MTT	(Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
nm	nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con ácido etilendiaminotetracético (PBS-EDTA sódico 0.9 mM)
pH	Potencial de Hidrógeno

QSAR	Estudios cuantitativos de relación estructura actividad por sus siglas en inglés: Quantitative Structure-Activity Relationship
REDOX	Óxido-Reducción
r.p.m	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio o Laurilsulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
Soln.	solución
TUNEL	Terminal Deoxinucleotidyl Transferase-Mediated Dntp Nick End Labeling (Marcaje de los extremos de ADN fragmentados con dUTP mediado por la enzima Desoxinucleotidil Transferasa)
μL	microlitros
μM	Concentración microMolar
%V/V	Porcentaje volumen/volumen

1.0 RESUMEN

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y FRAGMENTACIÓN DE ADN POR NUEVOS DERIVADOS DE TIAZOLO[5,4-b]QUINOLINA EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS.

El cáncer es uno de los padecimientos más frecuentes a nivel mundial que sigue requiriendo de investigación encaminada a la obtención de nuevos fármacos para su tratamiento, debido principalmente a la resistencia de células cancerosas hacia los actuales fármacos y a sus efectos adversos durante el tratamiento.

De los diferentes tipos de agentes antitumorales usados en la clínica, existen los que actúan como intercaladores de ADN. Se sabe que estos pueden inhibir la actividad de la ADN-topoisomerasa II induciendo fragmentación de ADN y llevar a la muerte celular las células tumorales. Entre los intercaladores de particular interés clínico en el tratamiento de leucemias se encuentran la amsacrina (m-AMSA), y la 4-metil-5-metilcarboxiamida.

En el presente trabajo, se reportan los resultados de la actividad citotóxica en líneas celulares humanas de cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas⁽⁵⁷⁾, considerados bioisómeros de m-AMSA y de acridina, con el objeto de aportar conocimiento acerca de su actividad biológica, específicamente en su capacidad de inhibición proliferativa en función de su estructura.

Se observó que el compuesto III, clorado en C-3 del residuo de anilina que está en el carbono del núcleo de tiazolo[5,4-b]quinolina, presentó la mayor actividad citotóxica ($IC_{50} = 10 \mu M$) en K-562, seguido del compuesto II y IV, mientras que el compuesto I, si bien presentó actividad, fue el menos activo de los cuatro.

El compuesto III indujo fragmentación de ADN, que se demostró mediante la detección de extremos 3'-OH libres, lo anterior aunado a una observación morfológica de daño celular como lo es la condensación de cromatina y encogimiento celular, sugieren que éste tipo de compuestos induce inhibición de la proliferación mediante la activación de muerte celular apoptótica.

2.0 JUSTIFICACIÓN

Dentro de los principales tratamientos actuales contra el cáncer se encuentran las terapias dirigidas con fármacos o combinaciones de fármacos que inducen a las células tumorales a una muerte por apoptosis; sin embargo un problema es la falta de distinguir con precisión las células cancerosas de las células normales (sanas) y de este modo afectar menos a las células normales, reducir los efectos secundarios adversos como ocurre con la gran mayoría de los compuestos actuales y en consecuencia mejorar la calidad de vida del paciente ⁽⁸¹⁾.

Dado el número de muertes que ocasiona el cáncer a escala mundial y el problema psicosocial y económico que conlleva, la búsqueda de mejores antitumorales se torna relevante, si bien, el cáncer puede ser curable y en algunos casos prevenible, en otros casos se presenta resistencia a la quimioterapia y sus efectos adversos son considerables ⁽⁸¹⁾. Por otro lado, existen reportes de series de síntesis de compuestos planares de tres o más anillos aromáticos con propiedades citotóxicas en líneas celulares tumorales, como por ejemplo de leucemias como es el caso de algunos derivados de acridina con capacidad de intercalarse en el ADN y con capacidad de reducir tumores sólidos de ratón y de inhibir la enzima ADN topoisomerasa II ⁽⁴⁾.

En trabajos recientes se ha reportado el diseño de nuevos derivados tiazolo[5,4-b]quinolina, los cuales son considerados isómeros de acridina ⁽⁶⁸⁾. Existen tres nuevas generaciones de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina diseñados por Lira Rocha y colaboradores ^(40, 57, 68, 69), donde en la primera se comprobó la intercalación al ADN y la actividad biológica, siendo el sustituyente notorio la alquilamina en la posición 2 en el anillo C ⁽⁶⁸⁾. La segunda generación exploró los diversos sustituyentes del grupo anilino, observándose que aportan incremento o disminución de la actividad citotóxica. En el presente trabajo se evaluó la actividad de cuatro nuevos derivados de la serie de tiazoloquinolinas con la característica estructural del grupo dietilpropilamina y sustituyentes en el grupo anilina en líneas celulares humanas con el propósito de incrementar su actividad citotóxica (IC_{50}) y adicionalmente evaluar la capacidad de fragmentar el ADN como un rasgo de inducción de muerte celular programada (MCP) tipo I o apoptosis.

3.0 ANTECEDENTES

3.1 CÁNCER

A lo largo de la evolución, la humanidad ha padecido diversas transformaciones que le han permitido adaptarse a su ambiente.

El desarrollo y evolución del hombre han girado en torno a preservar su equilibrio homeostático, lo que le ha llevado a intentar comprender los mecanismos que regulan lo que llamamos salud, desde niveles celulares hasta los órganos y tejidos que lo conforman; en esta búsqueda ha innovado y utilizado lo que la naturaleza le proporciona.

La enfermedad llamada cáncer es uno de los principales problemas de salud en todo el mundo, especialmente en países desarrollados donde oscila entre la segunda y tercera causa de muerte más frecuente.

En 2008, el 8.7% de los egresos hospitalarios por tumores malignos a nivel nacional fueron por leucemia.⁽⁸⁷⁾

En los hombres, el cáncer más frecuente es la leucemia (15.1%), mientras que en las mujeres es el de mama (8.4 %).

Para el 2008, la incidencia de cáncer de mama fue de 14.63 por cada 100 mil mujeres de 15 años y más.

La población masculina de 60 años y más presenta una tasa de mortalidad observada por cáncer de próstata de 121.69 por cada 100 mil hombres.

Entre las mujeres de 60 años y más, el cáncer en el cuello del útero tiene una tasa de mortalidad observada de 41.88 por cada 100 mil mujeres.

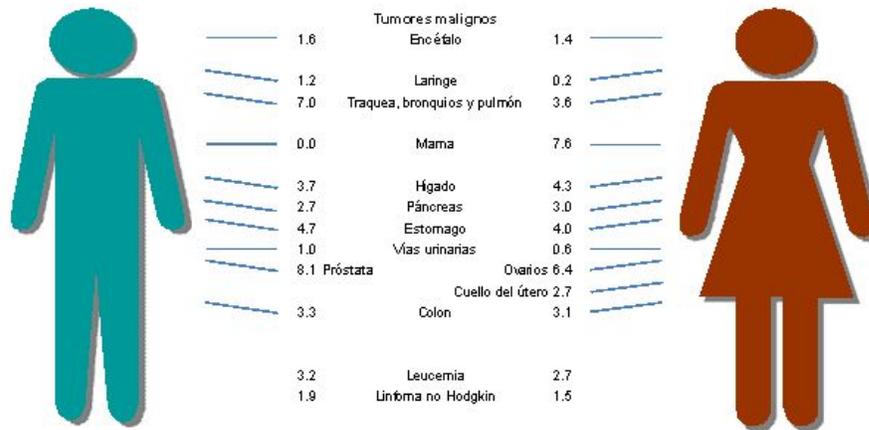
El último dato estadístico del INEGI (2008), refiere que dentro de las principales causas de muerte entre la población masculina mexicana están el cáncer de leucemia, próstata, tráquea, bronquios y pulmón (tasa observada de 60.33 por cada 100 mil habitantes), mientras que en la población femenina la mayor incidencia de muerte es el cáncer de mama, leucemia y cérvico uterino.⁽⁸⁷⁾. (Figura 1)

Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno para cada sexo 2008

Tipo de tumor maligno	Total	Hombres	Mujeres
Total	100.0	100.0	100.0
Leucemias	8.7	15.2	5.6
Mama	5.8	0.4	8.3
Cuello del útero	3.3	0.0	4.8
Ovario	2.1	0.0	3.1
Tráquea, bronquios y pulmón	2.0	4.1	1.0
Próstata	1.9	6.0	0.0
Del estómago	1.8	3.1	1.1
Del colon	1.8	3.2	1.2
Hígado	1.2	1.9	0.8
Del rectosigmoides, recto y ano	1.1	2.0	0.7
Vejiga	1.0	2.2	0.4
Labio, cavidad bucal y faringe	0.9	1.9	0.5
Páncreas	0.9	1.5	0.7
Cuerpo del útero	0.8	0.0	1.1
Melanoma y otro tumores de la piel	0.5	0.6	0.3
Esófago	0.4	1.1	0.1
Otros	65.8	56.8	70.3

Fuente: SSA, DGIS (2008). Egresos Hospitalarios 2008. Proceso INEGI.

Porcentaje de defunciones por tumores malignos para cada sexo 2008



Fuente: INEGI Estadísticas Vitales, Defunciones 2008. Base de datos.

Figura 1 Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos según sexo en México, de acuerdo a estadísticas vitales 2002. INEGI⁽⁸⁷⁾.

Durante los últimos treinta años ha llegado a consolidarse la hipótesis de que el cáncer es una enfermedad genética, que resulta cuando mutaciones múltiples son acumuladas en el ADN de una célula, causando la pérdida del control de la proliferación celular.⁽⁸¹⁾

El cuerpo humano esta constituido por miles de millones de células, y éstas a su vez están diferenciadas en muchos tipos celulares diferentes, que integran distintos

órganos y funciones, algunas otras como las de piel y células progenitoras se dividen con mucha mayor frecuencia para reemplazar billones de células que mueren cada día, luego entonces se pone de manifiesto que un cuidadoso programa controlado debe regular la proliferación celular. Algunas evidencias muestran que el surgimiento de un tumor se da cuando una sola célula pierde el sentido de dicho control. ⁽⁸¹⁾

A pesar de los avances, no se ha logrado llegar a un consenso general acerca de la definición del cáncer que pueda dejar claro los procesos de la enfermedad. Una definición general es la planteada por el patólogo J. Ewing: “Un neoplasma es un desarrollo de tejido hereditariamente alterado y, relativamente autónomo” ⁽³⁷⁾.

La definición de J. Ewing implica algunos conceptos que deben ser ampliados ⁽¹⁹⁾:

- Los cambios exhibidos por una célula neoplásica son hereditarios
- La autonomía indica que el cáncer no está completamente sujeto a la regulación de las células normales y en especial a las funciones del organismo
- El término “relativo” indica que los tumores no son totalmente autónomos, están sujetos al tejido en el cual se originan.

El entendimiento en las alteraciones moleculares básicas del cáncer es la meta principal en todos los estudios, así como la obtención de agentes terapéuticos efectivos y selectivos. La quimioterapia actual tiene como reto el uso de fármacos para tratar la enfermedad sin dañar al paciente. A pesar de que las células neoplásicas difieren de las normales en cuanto a requerimientos nutritivos, desafortunadamente no difieren lo suficiente en el aspecto biológico y químico.

Se conocen unos 100 tipos de cáncer en el humano, y a pesar de avances en métodos para su detección, tratamientos, y epidemiología, es en las últimas décadas cuando se empiezan a comprender las bases bioquímicas de este conjunto de enfermedades.

3.2 GENERALIDADES DEL CANCER

Las distintas formas de cáncer son clasificadas en uno de tres grupos;

1. *Carcinomas*: que son los desarrollados a partir de estirpes celulares de tejido laminar o epitelial (piel y sistema digestivo).
2. *Sarcomas*: que incluyen tumores de tejidos de soporte (médula, músculo y fibroblastos).
3. *Leucemias y linfomas*: incluyen cáncer de células que conforman la circulación sistémica (sangre y sistema inmune).

Otros autores consideran la siguiente clasificación de los tumores:

1. Los tumores benignos, como las verrugas y los lunares, se desarrollan por simple expansión y a menudo permanecen encapsulados por una capa de tejido conjuntivo, pocas veces representan una amenaza para la vida
2. Los tumores malignos o cáncer, se desarrollan de modo invasor, produciendo células que colonizan nuevas zonas del organismo, mediante un proceso denominado metástasis.

Pocos tipos de cáncer se asocian con la infancia, sin embargo existe una tendencia a contraer este padecimiento a medida que la edad avanza. Muchos son los factores que propician este hecho, siendo los ambientales los de principal importancia y a su vez que tenga como consecuencia el sitio o tipo de cáncer que se desarrolle ⁽⁸¹⁾. Las células tumorales adquieren un daño genético que las tipifica y regula directamente en su ciclo celular ⁽⁷¹⁾.

De las alteraciones que se producen en el ácido desoxirribonucleico (ADN), no todas son necesariamente dañinas, pues muchas ocasionan una mejor adaptación en los procesos evolutivos. El peligro se presenta en aquellas mutaciones cuyos efectos provocan reacciones adversas para el organismo, entre ellas el cáncer. Es importante tener en cuenta que un agente potencialmente citotóxico que ha logrado atravesar las

distintas barreras fisiológicas y llegar al interior del núcleo celular cercano al ADN y pueda afectar el material genético no es un evento que sea fácil de llevar a cabo y de forma simple, ya que la célula por sí misma cuenta con mecanismos de auto reparación mediado por una serie de eventos bioquímicos complejos. (Figura 2) ⁽²⁷⁾

La conversión de una célula normal a cancerosa, viene acompañada de cambios complejos, estructurales, bioquímicos y genéticos, es decir; la transformación es multifactorial y puede resumirse a grandes rasgos en un proceso de iniciación seguido de uno de promoción y después por un proceso de progresión.

La exposición a un carcinógeno, puede preparar a las células para la transformación en célula tumoral; sin embargo, el tumor puede no formarse sino hasta décadas después. Considerando que los carcinógenos pueden ser sustancias naturales o artificiales presentes en el ambiente, radiación electromagnética o partículas de energía suficiente para romper los enlaces químicos, e incluso algunos virus portadores de oncogenes, se puede presentar en términos generales dos etapas a nivel fisiológico por las cuales podrían llegar a interactuar o no con el ADN: la etapa toxicocinética (lo que el organismo le hace al agente carcinogéno) y la etapa toxodinámica (lo que el agente carcinogéno le hace al organismo) como se muestra en la figura 2.

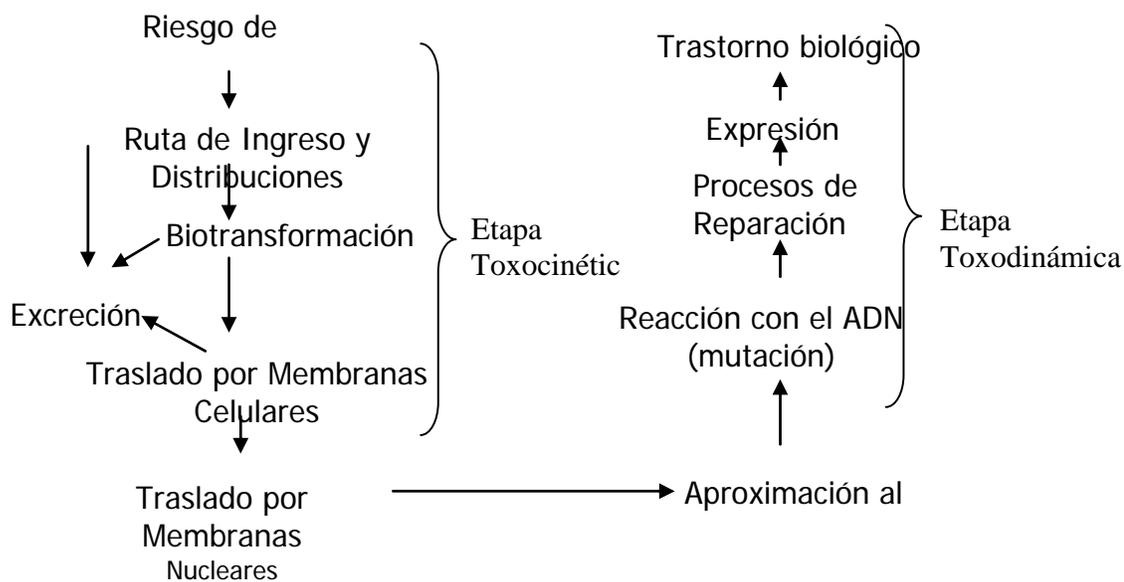


Figura 2. Paradigma toxicológico

Inicialmente existe un riesgo de exposición a algún agente genotóxico que es capaz de ingresar al organismo humano que dependiendo de la ruta de ingreso experimenta un proceso de biotransformación por los órganos del cuerpo humano, principalmente el hígado y/o sistema inmunológico donde puede consecuentemente ser excretado del cuerpo o por otro lado algún metabolito incluso poder atravesar las membranas celulares hasta llegar inclusive al núcleo (Etapa toxocinética). Al llegar al núcleo existe la aproximación al ADN con el cual experimenta una serie de reacciones (mediadas por enlaces covalentes, intercalación, etc) promoviendo mutación del ADN el cual mediante mecanismos de reparación puede eliminar el daño, de lo contrario se experimentará la expresión del daño como un trastorno biológico como lo es el cáncer. (Etapa toxodinámica).

3.3 BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

3.3.1 Ciclo Celular.

El ciclo celular de una célula eucariota normal constituye un conjunto ordenado de etapas que culmina con la división en dos células hijas. En condiciones fisiológicas, la división celular responde a estímulos proliferativos dentro de un proceso altamente regulado. En un ciclo celular completo, las células, además de duplicar fielmente su material genético, duplican también su masa celular dando lugar a dos células hijas idénticas. En los organismos unicelulares, cada división celular produce un nuevo organismo completo, mientras que, en los organismos pluricelulares, se precisan muchas divisiones celulares para dar lugar a un nuevo organismo. Asimismo, la duración del ciclo celular varía dependiendo del tipo de célula.

El ciclo celular, está formado por la concatenación de distintas fases por las que la célula transita desde el estado de reposo hasta la mitosis. Se compone de cuatro fases denominadas fase G1, fase S, fase G2 y fase M. El período de tiempo que transcurre entre dos mitosis y que comprende las fases G1, S y G2 se denomina interfase. La interfase es un período muy activo para la célula en la que se transcriben genes, se sintetizan proteínas y aumenta su masa. Junto a las fases G1, S, G2 y M, se usa el término G0 para describir aquellas células que han salido del ciclo celular y se encuentran en estado quiescente. (Ver. Fig.3)⁽⁷¹⁾

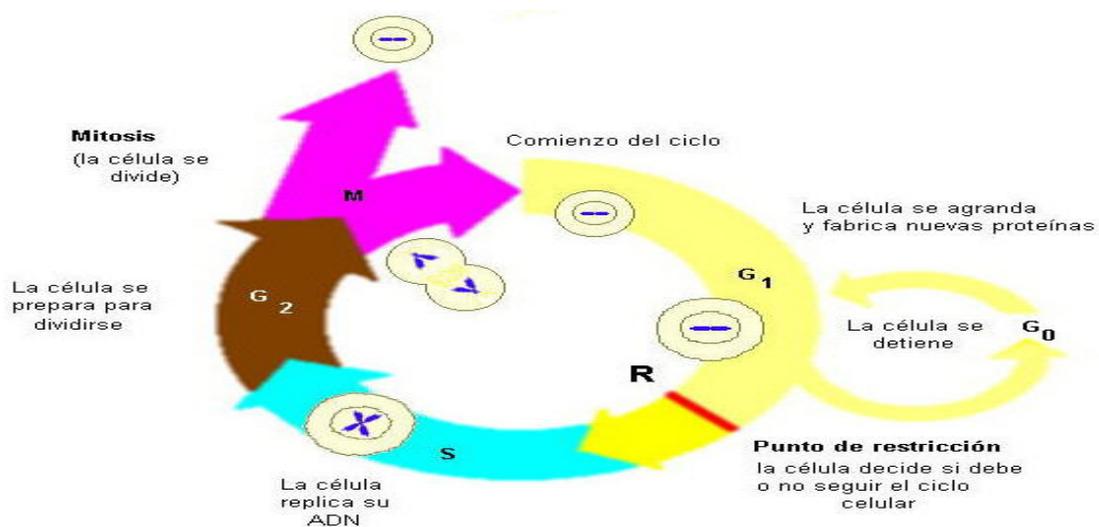


Figura 3 Fases del Ciclo Celular.

Existen diferentes complejos de quinasas dependientes de ciclinas-ciclinas que se forman durante las diferentes fases del ciclo; cada uno de estos complejos fosforila un abanico diferente de proteínas. De forma general se puede decir que los niveles de CDKs son relativamente constantes durante el ciclo, mientras que lo que varía son los niveles de ciclinas. Esto indica que, en parte, el comportamiento de estos complejos está determinado por estos niveles oscilantes de ciclinas [Tomado de: Referencia 91].

A grandes rasgos, la fase G₁ (GAP-1, intervalo 1) comprende una duración aproximada de ocho horas. Constituye la fase durante la cual las células se preparan para el proceso de síntesis de ADN y se caracteriza por la expresión génica y la síntesis de proteínas. Tanto en células animales como en levaduras, se ha identificado un importante punto en el control de la fase G₁ llamado punto de control o restricción R en las células animales y START en las levaduras. Algunos procesos oncogénicos ejercen su efecto en blancos particulares que regulan esta fase. En esta fase la célula responde a señales extracelulares. ⁽⁷¹⁾

La fase S (de síntesis) constituye la etapa en la que tiene lugar la síntesis de ADN con una duración muy similar a la de la fase G₁. La fase G₂ (GAP-2, intervalo 2) es aquélla en la que la célula se prepara para el proceso de división durante la cual revisa si la duplicación del ADN ha sido correcta antes de permitirle proceder a la

siguiente fase. En esta fase existe un segundo punto de control llamado punto de control G2-M.

La etapa M está definida por el desarrollo de la mitosis y constituye la fase en la que los cromosomas replicados son separados en dos núcleos diferentes formando dos células hijas. En esta etapa se lleva a cabo la división nuclear y citoplasmática, proceso denominado citocinesis.

Dentro de estas etapas existen reguladores bioquímicos que controlan el proceso. Durante las fases G0 y G1, la proteína p16 (inhibidor de cinasas: INK) y ciclina D1 están poco activas y por tanto la proteína pRB (proteína de retinoblastoma, que es una proteína supresora de tumores y normalmente se encuentra alterada en tumores malignos; llamada así por ser encontrada originalmente en cáncer de retina de donde deriva su nombre), se encuentra poco o nada fosforilada, mientras que al final de la fase G1 o en el inicio de la fase S, es fosforilada en múltiples aminoácidos por estas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Las ciclinas de la clase D (D1, D2 y D3) forman complejos con RB, la cual es fosforilada a continuación por las CDK4 y las CDK6. Datos recientes indican que RB es también fosforilada por complejos ciclina E-CDK2. La proteína RB es la encargada de controlar la salida de la fase G1 del ciclo, y esta vía se encuentra inactiva en tumores malignos humanos ⁽⁷¹⁾.

Al final de la fase M de la mitosis, la proteína RB vuelve a su estado hipofosforilado como resultado de la acción de las fosfatasas. Su nivel de fosforilación modula su interacción con los E2F (1, 2 y 3), factores de transcripción necesarios para la progresión de la fase S, que se unen a secuencias TTTCGCGC ⁽⁷¹⁾. Cuando su nivel de fosforilación es bajo (fases G0/G1), se une a E2F impidiendo su acción. Por otra parte, cuando se encuentra elevado (fases S/M), E2F se libera y es capaz de activar la transcripción de genes que son cruciales para la proliferación celular, como los que codifican las enzimas timidincinasa, timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa y la ADN polimerasa, que intervienen en la síntesis de ADN, así como c-myc, myb, CDC2/CDK1 y los genes de las ciclinas A y D1 y el propio gen E2F-1.

A su vez la proteína P53 interviene en el control del ciclo celular y de la replicación, así como en la reparación del ADN, y mantiene la estabilidad genómica. En

este sentido, la transcripción de P21 está regulada positivamente por el producto del gen supresor P53. La proteína P21 forma parte de los CDI, siendo un inhibidor de los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2 y bloqueando, por tanto, el ciclo celular en la transición G1-S. Además, P21 puede unirse a PCNA, subunidad de la ADN polimerasa delta, y así inhibir directamente la síntesis de ADN.

De esta forma, observamos que las CDK, que son reguladores básicos del ciclo celular, están compuestas por una unidad catalítica que forma complejos con unidades reguladoras llamadas ciclinas. Se conocen al menos nueve CDK y quince ciclinas. Los complejos CDK/ciclina se van formando y activando de una manera ordenada en respuesta a estímulos proliferativos tales como factores de crecimiento, hormonas y citocinas, e intervienen en la progresión del ciclo celular en sus distintas fases. Los complejos CDK/ciclina se encuentran, a su vez, regulados de forma negativa por inhibidores del ciclo celular, de los cuales se conocen dos grandes familias:

1. Familia KIP/CIP: esta familia incluye tres proteínas estructuralmente relacionadas entre sí: P21, P27 y P57; presenta una especificidad más amplia que la familia INK4. Sus miembros interactúan e inhiben la actividad cinasa de los complejos ciclina E/CDK2, ciclina D/CDK4, ciclina D/CDK6, ciclina A/CDK2 y ciclina B/CDC2, y actúa a lo largo del ciclo celular.
2. La familia INK4 incluye cinco proteínas: P14, P15, P16, P18 y P19, las cuales inhiben de forma específica los complejos de ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6 que se encuentran implicados en el control de la fase G1. A diferencia de las proteínas de la familia KIP/CIP que se unen en complejos ciclina/CDK, la familia INK4 se une a subunidades monoméricas, y su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas por las subunidades catalíticas CDK.

Numerosos estudios e investigaciones preclínicas y clínicas han demostrado que la mayoría de los procesos neoplásicos humanos presentan alteraciones en distintos elementos del ciclo celular, cuyo resultado se dirige a la pérdida de control del ciclo celular y la proliferación celular aberrante e incontrolada. Por este motivo, en los

últimos años se ha desarrollado un gran número de compuestos cuyo principal mecanismo de acción es la interferencia con anomalías del ciclo celular ⁽⁴²⁾.

3.3.2 Ciclinas

La maquinaria del ciclo celular se compone de dos elementos centrales; las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y las ciclinas (tabla 1). Las CDK fosforilan proteínas en los residuos ó en los aminoácidos serina y treonina. Estas cinasas suponen una oportunidad de amplificar la señal, ya que una sola molécula con actividad cinasa es capaz de modificar un gran número de ciclinas específicas en un corto período de tiempo ^(18,89).

CICLINAS	CDK ASOCIADA	FUNCIÓN
A	CDK1(CDC2), CDK2	Entrada en fase y transición en fase S
B1, B2	CDK1	Salida de G2, mitosis
C	CDK8	Transición G0-S
D1, D2, D3	CDK4, CDK6	Transición G0-S
E	CDK2	Transición G1-S
F	¿?	Transición G2-M
G1, G2	CDK5	Respuesta ante daño ADN
H	CDK7	Activación de cdk, regulación transcripcional, reparación ADN.
I	¿?	
K	¿?	Regulación transcripcional cdk
T1, T2	CDK9	Regulación transcripcional

¿? =Se desconoce.

Tabla 1 Ciclinas presentes en mamíferos.

3.3.3 Diferencias entre células normales y células cancerosas

La propiedad más obvia, y médicamente más significativa de las células cancerosas, es su tasa de proliferación incontrolada, pero más específicamente es que en tejidos normales maduros la tasa de proliferación iguala a la de muerte celular, mientras que en las neoplasias ésta última es superada por la de proliferación celular ⁽⁶⁵⁾.

En condiciones *in vitro*, las células normales forman una capa monocelular y entonces, mediante el proceso llamado inhibición por contacto, su división se detiene. En cambio en las células malignas esto no ocurre, por el contrario, forman capas pluricelulares; incluso, las células normales en ausencia de inhibición por contacto, tienen su capacidad de proliferación mucho más limitada, dependiendo de la especie y del organismo del que se tomen, dividiéndose solamente en cultivo, de 20 a 60 veces antes de que envejecan y mueran ⁽¹⁷⁾.

En los primeros estadios de un tumor, éste crece de manera constante, su tiempo de duplicación es característico, y varía de tamaño según el tipo de tejido (horas incluso meses), que por el contrario de lo que se piense estos tiempos están en un rango normal. ⁽⁶⁴⁾

Las membranas plasmáticas de las células malignas tienen un carácter más fluido que las células normales y presentan relaciones alteradas de muchos de los componentes de su superficie celular, como glucoproteínas y glicolípidos. Internamente, el citoesqueleto de una célula tumoral está menos organizado, probablemente, es lo que le da una apariencia más redondeada que la de las células normales correspondientes. Metabólicamente, muestran una tasa elevada de glucólisis, ocasionando una pérdida de energía que debilita al huésped.

La proliferación celular está estimulada por factores de crecimiento polipeptídicos semejantes a las hormonas. Estos mitógenos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), se unen con elevada afinidad a los dominios extracelulares de los receptores proteicos

específicos que se encuentran en la membrana plasmática de la célula, que a su vez activan dominios citoplasmáticos de los receptores que fosforilen a proteínas específicas o receptoras, que actúan como mensajeros intracelulares estimuladores de la división celular.

Muchos de los receptores de los factores de crecimiento son proteínas quinasas específicas de tirosina; es decir, que fosforilan grupos –OH de las tirosinas de sus proteínas específicas o receptoras. La mayoría fosforilan restos de aminoácidos de Serina (*Ser*) o Treonina (*Thr*), y solo uno de cada 2000 son restos de Tirosina (*Tyr*). Curiosamente muchas tirosin-quinasa activadas se fosforilan ellas mismas. Esta autofosforilación, estimula aun más la actividad de tirosin quinasa de los receptores activados, lo que mantiene el estado activo después de la disociación del factor de crecimiento.

3.3.4 Alteraciones genéticas asociadas al cáncer

Se han observado diferentes cambios genéticos, y aun se siguen investigando otros, algunos tipos son:

1.- Proteínas Alteradas

Un oncogén, puede producir un producto proteico que presente una actividad anómala en relación con la que manifiesta el proto-oncogén correspondiente (genes cuyos productos promueven el crecimiento y división celular y codifican para factores de transcripción E2F). Esto puede ser consecuencia de mutación puntual; como por ejemplo el proto-oncogen *c-ras*, más comúnmente implicado en tipos de cáncer humano.

2.- Secuencias Reguladoras Alteradas

Cambios genéticos que se observan como resultado de la expresión o activación elevada e inadecuada proteínas reguladoras del ciclo celular en celulares normales, tales como factores de transcripción (E2F).

3.- Reordenaciones Cromosómicas

Un oncogén, puede ser transcrito de forma incorrecta si, debido a una reordenación cromosómica, cae bajo el control de una secuencia reguladora extraña. Ejemplo, la translocación del proto-oncogén *c-myc* en el linfoma de Burkitt, cuyo incremento se correlaciona con el comienzo de la división celular.

4.- Amplificación Genética

La sobre expresión de un oncogén puede producirse también cuando éste se replica múltiples veces, bien en forma de copias cromosómicas repetidas secuencialmente o de partículas extra cromosómicas. La amplificación génica solo es mantenida por una fuerte presión selectiva, como la conferida por los fármacos. No se sabe como se mantiene la amplificación oncogénica.

5.- Inserción de un Virus en Cromosoma

La expresión inoportuna de un oncogén puede ser consecuencia de la inserción de un genoma vírico en un cromosoma celular, de forma que el proto-oncogén se encuentre bajo el control transcripcional de la secuencia reguladora del virus.

6.- Pérdida o Inactivación de Antioncogenes

La elevada frecuencia de determinados tipos de cáncer en una familia hace suponer que existe una predisposición genética. Tal es el caso del Retinoblastoma, en donde el segmento cromosómico afectado contiene el gen *Rb*, que codifica un factor que, de algún modo, reprime la proliferación celular incontrolada; es decir que dicho producto es un supresor tumoral. Una vía adicional por la que los oncogenes pueden producir cáncer es inactivando los productos de los antioncogenes de las células normales. Muchas veces, los tipos de cáncer de naturaleza hereditaria están asociados con genes supresores de tumores (antioncogenes), como el caso de *p53* (cuyo producto es una fosfoproteína nuclear implicada en la regulación negativa del ciclo celular e inducción de apoptosis).⁽¹⁷⁾

4.0 RESISTENCIA A FÁRMACOS

La resistencia a fármacos es una de las principales causas por lo cual la terapia clínica no funciona ⁽⁵⁹⁾.

Siendo que el ADN es el objetivo mayoritario de los agentes antineoplásicos, una vez que el fármaco ha llegado al citoplasma, se expone a diferentes mecanismos de detoxificación presentes en el citoplasma o inducidos por la presencia del agente antitumoral, incluso aun cuando ha causado daño al ADN, algunas células resistentes son capaces de reparar ese daño ⁽⁴⁸⁾. Por otro lado se puede tener que el tumor sea intrínsecamente resistente al compuesto o desarrollar resistencia durante el tratamiento.

La resistencia a fármacos se define como un estado de no susceptibilidad ó susceptibilidad disminuida al efecto de una concentración determinada de un fármaco, que en condiciones normales causa inhibición del crecimiento ó muerte celular. Por algún tipo de cambio genético en el organismo (bacterias, virus, parásitos) ó población de células implicadas (neoplásicas) se hace posible evadir ó resistir el efecto inducido por un determinado fármaco ⁽⁵⁰⁾. La resistencia puede clasificarse como intrínseca ó adquirida. La resistencia intrínseca puede deberse a la ausencia del receptor ó a que el fármaco no puede entrar a la célula y así llegar a su sitio de acción. La resistencia adquirida se da cuando poblaciones que son inicialmente susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación (mutación). La resistencia adquirida es percibida cuando un fármaco que es inicialmente efectivo para un fin terapéutico determinado deja de serlo. Los mecanismos que operan estas modificaciones genéticas en resistencia adquirida son:

a) mutación, donde el ADN de una célula susceptible sufre una alteración que induce modificaciones en la producción ó función normal de un componente celular, que es crucial para que el fármaco produzca su efecto farmacológico; la mutación va siempre acompañada de *selección* hacia la población mutante ó resistente, entonces las generaciones próximas serán hijas de las resistentes;

b) amplificación génica, donde existe una multiplicación exagerada de ciertos genes que inducen a la célula a sintetizar cantidades elevadas de un producto celular normal, de relevancia en la acción de un fármaco, lo que las convierte en resistentes a concentraciones de dicho compuesto que son altamente efectivas bajo condiciones normales;

c) transferencia génica, donde una célula/microorganismo susceptible adquiere de otro, material genético que induce resistencia hacia el efecto de un fármaco ó grupo de fármacos. ⁽⁵⁰⁾.

La resistencia a fármacos constituye un problema no solo en la terapia con agentes antitumorales sino que en contra de cualquier agente terapéutico.

La resistencia puede ocurrir en muchos niveles, incluyendo un incremento en la expulsión del fármaco, inactivación, alteración en el blanco, reparación del daño inducido y evasión de la apoptosis ⁽¹⁶⁾.

La principal limitante de numerosos agentes intercalantes de ADN es su susceptibilidad a mecanismos de resistencia celular. El comúnmente estudiado y de importancia clínica es la multiresistencia mediada por la *P*-glicoproteína, proveniente del incremento en la expresión de esta familia de glicoproteínas membranales y que actúan como bombas dependientes de ATP y aceleran la remoción del compuesto intracelular. La topoisomerasa II (homóloga a la ADN girasa bacteriana), se ha podido comprobar que esta relacionada con el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (MDR). ⁽²⁵⁾

El mecanismo propuesto por Robinson y Osheroff en 1990 para agentes que interaccionan con la topoisomerasa II y el ADN es la inhibición de la capacidad de la enzima para unir la cadena de ADN cortada y la muerte es proporcional al nivel de topoisomerasa II, lo que aumentara la citotoxicidad. No es sorprendente que la resistencia a fármacos se deba a niveles bajos de la topoisomerasa II o, que la topoisomerasa tipo I supla parcialmente las funciones de la tipo II. Un hecho relevante es que los niveles de topoisomerasa II más altos se han encontrado en timo y bazo, ya que mientras más enzima exista, mayor será la toxicidad de compuestos que inhiben la topoisomerasa II ⁽⁸⁾.

Las células incapaces de experimentar la apoptosis pueden ser más susceptibles a la acumulación de alteraciones genéticas que las células normales, lo cual les confiere sobrevivencia a las células tumorales. Este es uno de los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer y en la resistencia de los tumores a la quimioterapia o radioterapia ⁽³⁴⁾.

5.0 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre de manera normal, se lleva a cabo durante el desarrollo, recambio de los epitelios de revestimiento y homeostasis de numerosos órganos. Además de su papel fisiológico normal regulatorio del número celular de cada órgano, también es un mecanismo de defensa contra células tumorales, cuando éstas son sometidas a tratamientos, tales como radiación ionizante, calor, terapia hormonal, es decir, múltiples estímulos que dañan el ADN y por consiguiente afectan la progresión del ciclo celular y/o debido a una variedad de agentes quimioterapéuticos, como lo son los inhibidores o estabilizadores de los microtúbulos, inhibidores de la síntesis de ADN, o de las topoisomerasas ^(28, 34, 57, 71, 82, 83).

La muerte celular apoptótica se caracteriza por la activación de proteasas y nucleasas que llevan a la condensación de la cromatina ⁽⁵⁸⁾, en contraste con la necrosis que es concebida como una muerte celular pasiva regulada (tabla 2). La apoptosis conocida morfológicamente como muerte célula programada PCD ^(47,35) en numerosos estudios se ha demostrado que puede ser dependiente o independiente de p53 por arresto en la fase G1 y G2/M después del daño al ADN, de ahí que blancos del ciclo celular y de la vía apoptótica emerjan como un acercamiento atractivo para el tratamiento del cáncer ⁽⁸⁵⁾.

6.0 ADN TOPOISOMERASAS Y EL CÁNCER

Desde los años cincuenta en que se descubrió la estructura del ADN, el soporte de la información genética pasó a ser un objeto tangible. Desde entonces se ha trabajado en los mecanismos moleculares implicados en la replicación, recombinación y reparación del ADN. ⁽⁶⁶⁾

Los cambios de torsión y súper enrollamiento generados en la doble hélice determinan su conformación local a lo largo del cromosoma, influyendo notablemente en la transcripción y recombinación del genoma.

En los años setenta se descubrió a las enzimas implicadas en este proceso denominadas topoisomerasas, con dos rasgos distintivos que las caracterizan: pueden cortar y empalmar repetidamente los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos constituyentes de las cadenas de ADN permitiendo que otras cadenas de ADN pasen entre los dos cabos momentáneamente escindidos que mantiene sujetos con firmeza. ⁽⁶⁶⁾

La topoisomerasa II se expresa principalmente durante la fase proliferativa, aumentando los niveles durante la replicación del ADN y continúa incrementándose durante las fases S y G2 hasta alcanzar sus valores máximos al final de G2/M, para posteriormente disminuir al final de la mitosis.

Así, la denominada topoisomerasa tipo II (que corta las dos cadenas), se convirtió en blanco de acción de distintos agentes antitumorales; por ejemplo, se ha observado citotoxicidad máxima del etopósido (intercalador del ADN) durante la fase S, aunque no se descarta que las interacciones con otros mecanismos conduzcan a la muerte celular ⁽¹³⁾, a pesar de que los compuestos que se pueden combinar con el ADN, lo pueden hacer en cualquier momento del ciclo, el ADN está más expuesto durante la fase G1-G0, de modo que se podría decir que poseen cierta selectividad de fase, ⁽⁶⁴⁾ y cuando la enzima ADN topoisomerasa II se encuentre en sus máximos niveles, la célula será más susceptible, haciendo al compuesto selectivo de fase S y G2.

6.1 Inhibidores de la Topoisomerasa II

Como se puede deducir, las topoisomerasas, y en particular la tipo II, es una enzima nuclear esencial que se requiere para mantener la estructura cromosomal, la condensación, y la segregación, juega un papel principal en la replicación, transcripción y recombinación del ADN. ^(1, 66) Cada subunidad homodimérica rompe una hebra de ADN, la empalma y religa disminuyendo a su vez la tensión de la cadena. (Figura 4, Figura 5)

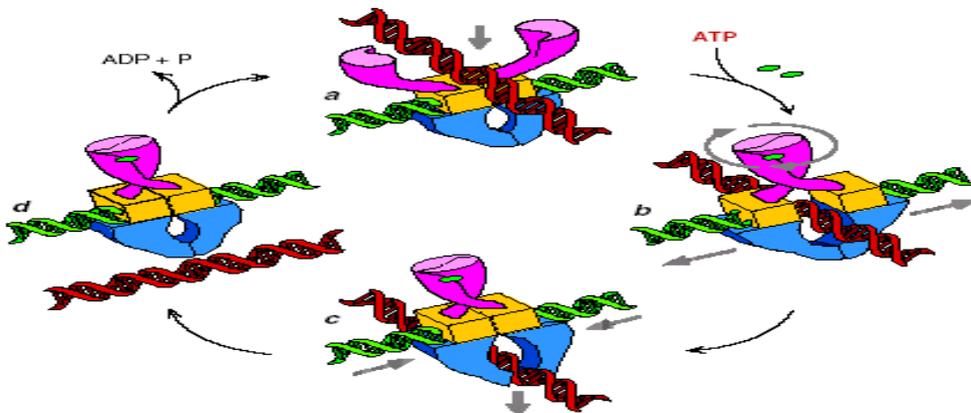


Figura 4. Modelo de una topoisomerasa II activa.

Cuando la topoisomerasa interacciona con el ADN, acomoda en su interior primero al segmento G (horizontal) y queda a la espera de la aparición del segmento T (diagonal) (a). La unión del ATP provoca la dimerización de los dominios amino terminales (en la parte superior); el cierre de ésta compuerta captura al segmento T hacia el interior de la enzima (b). En su trayecto, el segmento T se abre paso a través del corte producido en el segmento G, se estrecha el diámetro de la cavidad central; el segmento T se ve entonces forzado a salir de la misma cruzando la principal región de dimerización de la misma (c). Una vez que la compuerta de salida ha vuelto a cerrarse (d), la hidrólisis del ATP permite a la topoisomerasa adquirir su configuración inicial para iniciar un nuevo ciclo de transporte de ADN. [Tomado de Joaquim Roca, Investigación y ciencia. Octubre, 2002]

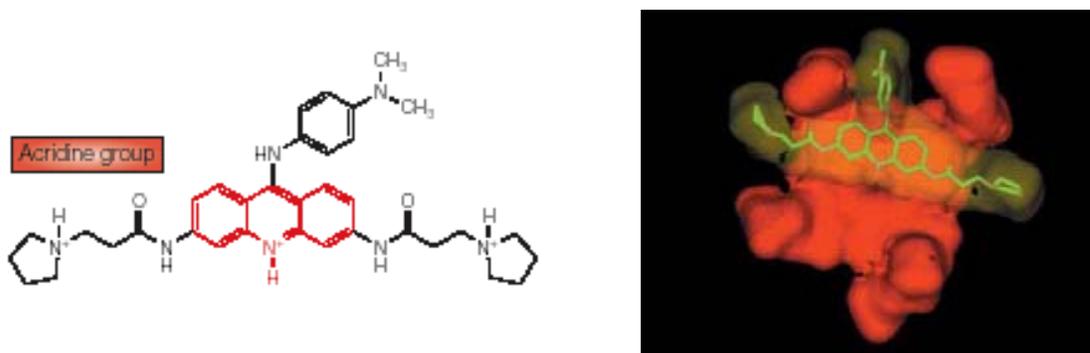


Figura 5. Modelo molecular de intercalación del núcleo de acridina tri-sustituída enlazada a la región cuádruple de G-ADN. [Tomado de: Nature Reviews Cancer 5, 285-296. April 2005 | doi:10.1038/nrc1587. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. Stephen Neidle & David E. Thurston]

Algunos agentes no intercalantes como la epidofilotoxinas funcionan formando complejos covalentes de ADN/FARMACO/TOPO-II. Por otro lado las antraciclinas, mitoxantronas, amsacrina y dactinomicina son agentes intercaladores que interfieren con la actividad normal de la topoisomerasa II, ambas categorías reducen la capacidad catalítica de la enzima en la religación de la doble cadena cortada, estabilizando el intermediario ADN-enzima. (Figura 6) ^(1, 75)

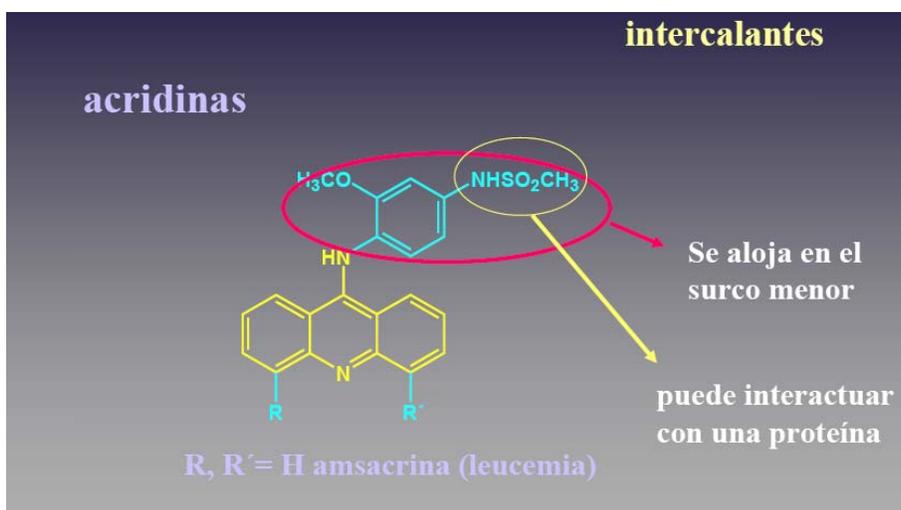


Figura 6. Amsacrina; ejemplo de intercalador utilizado en el tratamiento contra la Leucemia. [Tomado de: Referencia 92, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina].

Muchos intercaladores de ADN presentan actividad antitumoral.⁽⁸⁰⁾; entre estos, acridinas, antraciclina, y actinomicinas se han estudiado a detalle.

Algunas acridinas son citotóxicas en líneas celulares de leucemia y en tumores sólidos de ratón observándose su interacción con el ADN y la inhibición de la ADN topoisomerasa II. En la quimioterapia del cáncer, comienza a incrementarse el papel activo que juegan las topoisomerasas en la expresión de actividad citotóxica de los fármacos. Existe la evidencia de que la ADN topoisomerasa II constituye un blanco de acción para agentes antitumorales.⁽²⁰⁾ La amsacrina (m-AMSA), antraciclina, actinomicinas y la 4-metil-5-metilcarboxiamida son de particular interés clínico en el tratamiento de leucemias. A pesar de que hasta ahora ningún parámetro singular de estos intercaladores se correlaciona con su citotoxicidad, es muy claro que el daño que ocasionan al ADN es el responsable de su actividad citotóxica induciendo su notable fragmentación, y en el caso del isómero activo de la acridina; el m-AMSA, se encontró que estimula el rompimiento de las hebras por parte de la ADN topoisomerasa II⁽⁷⁷⁾, y que el ATP estimula esta reacción. (Figura 7)

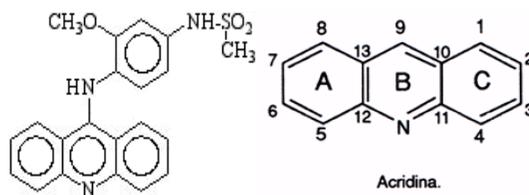


Figura 7. Estructura de m-AMSA en comparación con el núcleo de acridina

La topoisomerasa II se une por la parte del fósforo 5'-terminal de cada hebra de ADN vía generación de un grupo fosfotirosil.⁽²⁰⁾ Algo similar se observó con las antraciclina intercaladores doxorubicina (adriamicina)^(7, 30) y Actinomicina además se sabe que participan en la generación de radicales libres (lo que se asocia a su cardiotoxicidad) en la célula e interactúan con las membranas celulares modificando su función, por lo que siguiendo con la misma hipótesis de mecanismo de acción se siguieron probando otro tipo de compuestos.

En muchos casos los agentes intercaladores inhiben la actividad de la topoisomerasa (tanto la tipo I como II), con el ADN por estabilización a manera abortiva de un complejo ternario intermediario de la reacción catalítica en el cual se da el rompimiento de la(s) hebra(s) del ADN, pero no puede ser ligada nuevamente por la topoisomerasa. ^(36, 51, 65). (Figura 8)

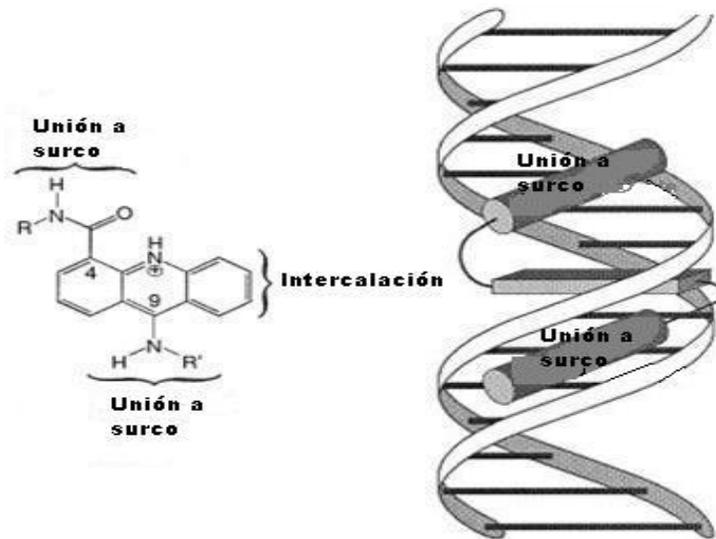


Figura 8. Esquema de intercalación de acridina en la molécula del ADN. [Tomado de Carlson CB, 2000]

Otros compuestos coplanares que muestran actividad citotóxica por intercalación, enlace covalente al ADN e interferencia en la actividad de la topoisomerasa tipo II son elipticina y sus derivados 2-metil-9-hidroxielipticina, siendo estos potentes agentes antitumorales. Sin embargo el bromuro de etidio, el cual es un fuerte intercalador, no presenta actividad antitumoral ni inhibe la actividad catalítica de la topoisomerasa II. Otro punto importante es que intercaladores similares inducen el rompimiento del ADN en similares sitios de la secuencia y viceversa ^(13,20).

Otro tipo de compuestos que actúan contra la topoisomerasa pero que no son intercaladores son los derivados glicosídicos de podofilotoxinas, como el etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26). Inhiben la síntesis de ADN y RNA e inducen fragmentación cromosomal ⁽²⁰⁾.

Compuestos relacionados estructuralmente a las quinolinas y acridinas por sustitución isostérica del residuo bencénico por un anillo de tiazolo han sido evaluados y reportadas en la literatura, en esta se ha indicado que presentaron citotoxicidad en la línea linfoide de ratón (P-388), carcinoma humano de pulmón (A-549) y tumor de colon de humano (HT-29). El compuesto 2-[[2-(N,N-dietilamino)etil]amino]-7-fluoro-9-hidroxitiazolo[5,4-b]quinolina fue el más activo de toda la serie en las líneas celulares P-388 y A-549. En este estudio se observó que la presencia de un átomo de flúor en la posición 7 o un grupo [(N,N-dietil)etil]amino en la posición 2, eran factores importantes para la inducción de una actividad antitumoral significativa.

Como se mencionó anteriormente, algunos derivados de la acridina son potentes agentes antitumorales habiendo reportado, que son sustancias activas en líneas celulares de leucemia y en tumores sólidos de ratón, además de que son capaces de unirse al ADN ⁽⁷⁵⁾. Esta última propiedad no necesariamente es un reflejo de actividad citotóxica, por ejemplo, la 9-anilinoacridina se intercala con el ADN pero carece de actividad citotóxica. Las acridinas citotóxicamente activas interactúan con el ADN e inhiben la actividad de la topoisomerasa II. Este es el caso de la amsacrina (m-AMSA), sustancia empleada en el tratamiento de la leucemia, cuya IC_{50%} en la línea celular promielocítica HL-60 es de 0.01 µg/mL. ^(31, 75)

Derivados de amsacrina sustituidos en el anillo de acridina, con el grupo metil, etil e isopropil en las posiciones 2, 3 y 4 respectivamente son agentes intercalantes y citotóxicos, mientras que los grupos *tert*-butil, por el contrario inhibieron la intercalación y la actividad antitumoral ⁽²⁰⁾.

Adicionalmente se ha reportado que algunas quinolinas son inhibidores antimitóticos ⁽⁸³⁾. Algunos de estos compuestos presentan actividad citotóxica significativa, con relación a su actividad intercalante (inserción del cromóforo entre los pares de bases).

Diversos compuestos citotóxicos, como la citosina arabinósido (ara C), taxol y etoposido; inducen apoptosis en líneas celulares, al igual que algunas acridinas. Resultados publicados previamente en el caso de m-AMSA han demostrado que aumentan la ruptura de ADN vía la inhibición de la enzima ADN topoisomerasa II, produciendo apoptosis ^(7, 9, 20).

Después del surgimiento de la Amsacrina, le siguieron análogos llamados de “segunda generación” enfocados en aumentar la fuerza de enlace al ADN, con mejor

solubilidad acuosa y un pK_a mas bajo (para favorecer las propiedades de distribución). Algunos trabajos se encaminaron en la posibilidad de introducir sustituyentes de carboxiamida, resultando de un tamizaje la 4-Metil-5-metilcarboxiamida con propiedades fisicoquímicas mejoradas.⁽²⁰⁾

Otras quinolinas recientemente reportadas son las 2-Fenilpirroloquinolin-4-onas que demostraron tener actividad *in vivo* sobre tumores sólidos, pero al parecer su mecanismo de acción involucra la inhibición de la aromatasa y no la topoisomerasa II⁽²⁴⁾.

7.0 TERAPÉUTICA DE LAS LEUCEMIAS.

La quimioterapia de las leucemias comprende una variedad de agentes alquilantes, los análogos de purina, alcaloides de la vinca, los intercaladores de ADN, los antibióticos, las hidroxureas y los adrenocorticosteroides.⁽²²⁾

Antes de la década de 1940 el principal tratamiento no quirúrgico de neoplasias era la radioterapia y el radio, algunos arsenicales y el uretano, en esa década el desarrollo fue considerable para los radioisótopos, mostazas nitrogenadas y antifolatos, el desarrollo de hormonas sexuales, corticoides suprarrenales y ACTH este último para el tratamiento de leucemia; sin embargo, pronto se descubrió que solo eran paliativos.⁽⁶⁴⁾

Por otro lado, las universidades y la creación de institutos, comenzaron la implementación rutinaria en busca de nuevos agentes antitumorales, como por ejemplo, el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, desde abril de 1990, lleva a cabo ensayos que consisten en un tamizado *in vitro* para evaluar la eficacia de compuestos ya sintetizados y/o productos naturales antitumorales o de otras aplicaciones clínicas que pudieran actuar como antineoplásicos. Estos ensayos a la fecha han permitido la evaluación de cientos de compuestos bajo condiciones idénticas y estandarizadas.^(20, 84). En una primera etapa se determina la citotoxicidad, empleando líneas celulares tumorales y posteriormente se estudia la regresión de tumores implantados en ratones.

Actualmente las principales terapias contra los tipos de cáncer son la cirugía, la radiación y la quimioterapia que en algunos casos han sido adyuvantes entre sí obteniéndose mejores resultados en el tratamiento de los pacientes ⁽⁵⁶⁾. Si bien existen tratamientos quimioterapéuticos que han tenido éxito en la remisión o cura en muchos tipos de cáncer, la obtención de nuevos compuestos que puedan actuar contra los tumores, así como de disminuir los efectos secundarios no deseados sigue siendo relevante.

Muchos de los compuestos estudiados provienen de compuestos naturales y/o sintetizados en el laboratorio entre estos se ha reportado la actividad citotóxica de derivados de lactonas sesquiterpénicas, cumarinas, derivados de la epotilona y derivados de tiazolo quinolina ⁽⁶³⁾.

Estudios básicos y clínicos han establecido que muchos agentes anticancerígenos inducen apoptosis y que la inhibición de este programa puede reducir la sensibilidad al tratamiento, aunque también es sabido que la apoptosis no es la única respuesta en la terapia del cáncer, y otros mecanismos de muerte no apoptótica suelen estar involucrados ⁽²⁹⁾.

Desde ya hace algunos años (1960), compuestos con núcleos de quinolina han sido desarrollados extensamente como agentes antimicrobianos y antiparasitarios, representando algunos de los más efectivos agentes usados en la clínica microbiológica, observándose que su blanco es la ADN Girasa, contraparte procariótica de la ADN topoisomerasa II, de estos estudios surgió pues la evidencia de que las quinolinas podrían ser potenciales agentes antineoplásicos ⁽⁶⁵⁾

El tejido hematopoyético abarca la médula ósea; está formado por las células que dan origen a los eritrocitos, granulocitos, monocitos y plaquetas. ⁽⁵³⁾

La leucemia, neoplasia maligna de las células precursoras hematopoyéticas, se caracteriza por una sustitución de la médula ósea por células neoplásicas, que difunden a la sangre, pueden infiltrarse al hígado, bazo, ganglios linfáticos y otros tejidos del organismo; este exceso de células anormales da origen a la leucemia.

Existen varios tipos de leucemias y difieren en su fisiopatología o en sus manifestaciones clínicas, lo común a todos los tipos es la presencia de depresión de la médula ósea, fatiga, anemia, anorexia y pérdida de peso; es muy agresiva y de incidencia en todas las edades. ⁽²²⁾

Los tumores de tejidos linforreticulares y hematopoyéticos son prácticamente todos malignos. Hay tres grupos principales de neoplasias: linfoma, leucemia y mieloma ⁽⁵³⁾.

7.1 Quinolinas y la Leucemia

La actividad de diversos compuestos tricíclicos ha sido estudiada en busca de mejores agentes antitumorales, particularmente 9-arilaminoacridinas, cuya actividad se debe a su interacción con el ADN, un ejemplo es la amsacrina como potente fármaco antileucémico y moderado agente intercalador del ADN ⁽⁴⁾.

Álvarez-Ibarra y colaboradores en 1997 sintetizaron derivados tiazolo[5,4-b]quinolinas encontrando propiedades como agentes antitumorales potenciales, cuyos resultados muestran una actividad citotóxica significativa *in vitro* contra células P-388 de leucemia murina. Dichos derivados se encuentran relacionados con las quinolinas y acridinas mediante una sustitución isostérica de un anillo de benceno por un anillo tiazolo ⁽⁴⁾.

Derivados de acridina, como la 4'-(9-acridinilamino)metansulfon-*m*-anisidina (m-AMSA), han sido clínicamente usados para el tratamiento de Leucemia y es uno de los miembros desarrollados como parte de la serie de las 9-anilinoquinolinas, siendo el primer agente antitumoral reportado en 1971. ⁽⁹⁾ Cain y colaboradores comenzaron desde los años sesenta a estudiar sales bis-cuaternarias con efectividad experimental en leucemia; años después reportaron, basándose en el diseño estructura - actividad, que de la serie de anilinoacridinas los parámetros de mayor relevancia en la actividad biológica eran el balance lipofílico-hidrofílico-electrón, siendo m-AMSA el primer agente eficaz reportado como derivado de acridina contra células L1210 de Leucemia. ⁽⁴⁵⁾

Estudios posteriores demostraron que la variación en los sustituyentes del anillo de la anilina de las 9-anilinoacridinas, llevaron a concluir que los grupos electrodonadores mejoraban la actividad citotóxica, y su distribución en el anillo era determinante, siendo la sustitución en 4' (nitrógeno de la anilina) la que más favorecía la actividad biológica, y si se removía el grupo amino daba como resultado la pérdida de la actividad; por otro lado, las 4'-sulfonamidas también fueron activas, observando que el compuesto sustituido en 2'-OCH₃ (*m*-AMSA) incrementó 6.7 veces su actividad respecto del no sustituido. ⁽⁶⁾

Nelson y Pommier más tarde demostraron que estas acridinas poseen su actividad citotóxica teniendo como blanco la inhibición de las funciones de corte y empalme de la enzima ADN topoisomerasa II, mecanismo que parece ser común a los intercaladores de ADN como lo son las quinolinas. ⁽⁵⁵⁾ Estas dos actividades intrínsecas de los núcleos de quinolina, se ha observado que pueden ser diferencialmente influenciadas por modificación de los sustituyentes de la molécula ⁽⁶⁵⁾.

Otro grupo, las imidazoacridonas se sabe que inducen un arresto irreversible en la fase G2 del ciclo celular seguido de apoptosis en células de leucemia murina y de carcinoma ovárico humano, lo que posteriormente a las células remanentes conduce a una muerte por catástrofe mitótica ⁽³¹⁾.

Como se mencionó, algunos derivados de la acridina son citotóxicos, siendo agentes potencialmente antitumorales ya que son capaces de unirse al ADN, sin embargo no todos los intercaladores son compuestos activos. El caso del grupo que constituyen las imidazoacridonas, agentes antitumorales que exhiben una elevada citotoxicidad y actividad antitumoral en experimentos de modelos tumorales como el de cáncer colorectal, poseen la ventaja de que no son cardiotóxicos como el caso adverso de otras acridonas. En el caso del compuesto C-1311, una quinolina altamente citotóxica, no se enlaza covalentemente al ADN por intercalación, sin embargo su afinidad no se correlaciona a su actividad antitumoral, pero se sabe que inhibe la actividad catalítica de ADN topoisomerasa II ⁽³¹⁾.

Otra isoquinolina de síntesis de 1992 por Michalsky y probada como prominente agente citostático es el Oracin, que actualmente se encuentra en fase II de investigación clínica. De su estructura química se puede inferir que se intercala en el

ADN, similar a los antibióticos del grupo de antraciclinas (antraquinonas sintéticas), sin embargo, también se ha observado la inhibición de la topoisomerasa II, algo que cabe destacar es que este compuesto puede ser empleado de manea oral y administración parenteral, como lo demostraron los estudios en ratones y ratas, aparte de no mostrar cardiotoxicidad y dar resultados negativos en la prueba de Ames (mutagenicidad), baja hepatotoxicidad y farmacocinética favorable. ⁽⁷⁸⁾

Otro tipo de quimioterapia en el que involucra las quinolinas, es el reportado como la fotoquimioterapia (PCT), basado en suplir al tejido blanco (cáncer) con un agente fotoactivo seguido de iluminación del tumor con luz que producirá especies que son altamente tóxicas para el tejido, como ejemplo se tienen los reportados por Nasser y colaboradores: quinifuril y nitracrina, que demostraron citotoxicidad contra linfocitos, contra células tumorales de melanoma B16, contra células tumorales de linfo leucemia P388 y contra células tumorales de eritroleucemia K562, observando que con iluminación de luz visible, las concentraciones tóxicas de los nuevos fármacos, para estas células disminuyeron considerablemente, es decir hubo foto-activación del compuesto antitumoral ⁽⁵²⁾.

Otras estrategias que colocan a las quinolinas como agentes potenciales en la clínica oncológica, es que se ha encontrado que inducen la diferenciación en las células tumorales, lo que implica el uso de fármacos capaces de modular la expresión génica que controla el crecimiento del tumor y se ha investigado en recientes años como una alternativa en la terapia del cáncer, siendo el blanco la enzima Histona deacetilasa. Se ha utilizado la reducción en los niveles de la proteína E2F1 como biomarcador de daño al ADN, mecanísticamente importante en la actividad de diferenciación y antiproliferación de algunas quinolinas ⁽²⁾.

Una gran cantidad de compuestos tricíclicos han sido sintetizados y estudiados en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales, particularmente las 9-amidoacridonas, 9-aril, 9-alkilaminoacridinas o 9-arilaminoacridinas, o sin sustituyentes en las posiciones 3, 4, y/o 5 han sido caracterizados presentando actividad antiproliferativa en células tumorales ^(68,69). Lo común de estos agentes es su interacción con el ADN y la inhibición de actividad de la topoisomerasa II.

7.2 Agentes que Reaccionan con el ADN

Los fármacos pueden interaccionar con el ADN de forma covalente o no covalente, que a su vez pueden modular la funcionalidad del ADN ó conducir a la muerte celular.

Las interacciones no covalentes pueden ser:

- a) *electrostáticas externas*: iones que reconocen la forma del ADN (fosfatos), poco específica con tiempos de residencia cortos (0.1 a 100 nanosegundos)
- b) *unión a los surcos*: unión mucho más específica, suele suceder en el surco estrecho del ADN y en el ancho del RNA.
- c) *Intercalación*: interacción que se da a la abertura del ADN y la disposición del fármaco total o parcialmente entre un par de bases del ADN.

Con el objetivo a través de la historia de las síntesis de moléculas intercalantes que explicaran una relación estructura actividad citotóxica, se diseñó la 9-anilinoacridina (derivado de la amsacrina). Los primeros estudios en tratar de elucidar su mecanismo de acción encontraron que distorsionaban la estructura del ADN, e inhibían la síntesis de ácidos nucleicos, después se demostró la reversibilidad del enlace al ADN. Se observó que la actividad citotóxica de algunos de estos nuevos compuestos era dependiente de la presencia de oxígeno, sin embargo el rompimiento de las hebras de ADN es independiente de la presencia de oxígeno, por lo que al observar el patrón característico de rompimiento de una proteína enlazada covalentemente por el extremo 5' terminal, como lo es el de la topoisomerasa II, permitió sugerir que la topoisomerasa II estaba involucrada, pues la actividad catalítica de ésta enzima es dependiente de la presencia de oxígeno.

La intercalación del ADN entre dos pares de bases se estabiliza por interacciones de "*stacking*" (apilamiento). La estructura de los intercalantes contiene anillos aromáticos normalmente igual o superior a los tres ciclos, de los que cuelgan grupos laterales capaces de ubicarse a lo largo de los surcos (típicamente el menor). Normalmente hay grupos cargados, ya sea en el anillo, o los grupos laterales, algo lógico ya que deben interactuar con un poli anión como el ADN.

Los agentes que reaccionan con el ADN son empleados en la terapéutica contra el cáncer en combinación con algunos antimetabolitos. Estos agentes son de distintos tipos de compuestos los cuales ejercen su efecto citotóxico en las células tumorales por reaccionar químicamente con su ADN. Típicamente reaccionan con bases de Guanina y Citosina frente a zonas Adenina Timina y, presentan preferencia en general por secuencias g(5'CG3') frente a pasos d(5'GC3'), aunque las razones fisicoquímicas no están claras, dan por resultado la formación de aductos de ADN, un producto intra o inter-hebra por enlace cruzado, o un enlace cruzado proteína-ADN ⁽²⁰⁾.

Por todo lo anterior y aunque los compuestos 9-anilinoacridinas, tales como la m-Amsa, son potentes intercaladores que inhiben a la topoisomerasa II, su uso clínico es limitado debido principalmente a sus efectos adversos, se justifica la necesidad de aprovechar la intercalación e inhibición de la topoisomerasa II como blanco terapéutico para proponer novedosos compuestos que puedan tener menos efectos adversos tales como los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas.

Tipo de Muerte Celular⁽²⁹⁾	Cambios Morfológicos en Núcleo	Membrana Celular	Citoplasma	Característica Bioquímica	Métodos de Detección Comunes
Apoptosis	Condensación de la cromatina; fragmentación nuclear; patrón de escalera de ADN	Cambios morfológicos visibles	Fragmentación (formación de cuerpos apoptótica)	Dependiente de caspasas	Microscopía electrónica; tinción de TUNEL; tinción de anexina; ensayos de actividad de caspasas; ensayos de fragmentación de ADN; citometría de flujo aumentando poblaciones celulares en subG1/G0; detección de cambios potenciales en membrana mitocondrial
Autofagia	Condensación parcial de la cromatina; no daño al ADN	Cambios morfológicos visibles	Incremento en el número de vesículas autofágicas	Independiente de caspasas; incremento en la actividad lisosomal	Microscopía electrónica; ensayos de degradación de proteínas; marcaje de translocación de proteínas autofágicas membranales; Tinción Monodanisilcadaverina (MDC)
Catástrofe Mitótica	Micronúcleos múltiples; Fragmentación nuclear	-	-	Independiente de caspasas (en estadios tempranos); activación anormal de CDK1/Ciclina B1	Microscopía electrónica Marcaje de marcadores mitóticos (MPM2); tinción de TUNEL
Necrosis	Degradación al ADN aleatorio	Inflamación; ruptura	Incremento de la Vacuolización; degeneración de organelos; inflamación mitocondrial	-	Microscopía electrónica; tinción nuclear negativa, detección de inflamación y daño cercano a la lesión
Senescencia	Estructura característica de la cromatina.	-	Aplanamiento e incremento de la granularidad	Actividad de SA-β-gal	Microscopía electrónica; tinción SA-β-gal; ensayos de arresto en el crecimiento celular; incremento de p53; ensayos para la fosforilación de RB; actividad de metaloproteínas (Sobre reguladas)

Tabla 2. Características de Diferentes Tipos de Muerte Celular

La apoptosis puede ser virtualmente inducida en todos los tumores malignos ⁽³⁴⁾ mediante el tratamiento con agentes genotóxicos usados frecuentemente en la terapia del cáncer, o incluso con otros agentes que dañan el ADN ^(7, 14, 18, 29). Estos estímulos provocan una respuesta celular compleja que incluye un bloqueo reversible en la progresión del ciclo celular en las fases G1 y G2, ante la necesidad de las células para reparar el ADN dañado antes de llevarse a cabo la replicación y la segregación mitótica cromosómica ^(7, 14, 18, 29). Así las señales apoptóticas son activadas por diversos estímulos que convergen hacia un camino de muerte común, en donde las proteínas de la familia Bcl-2 actúan como reguladores y la familia de las caspasas (cisteín proteasas) como transductores de señales ⁽²⁶⁾.

Así el mecanismo de apoptosis es una importante vía en la citotoxicidad inducida por compuestos anticancerígenos ⁽³⁴⁾. Numerosos trabajos reportados en la literatura han señalado que los fármacos tales como taxol, vinblastina ⁽³⁹⁾, etopósido, ara-C, adriamicina, así como numerosos compuestos citotóxicos de origen natural, actualmente en estudio, inducen la muerte de las células tumorales a través de un programa de muerte celular programado o apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Las características morfológicas de la apoptosis fueron descritas y caracterizadas hace más de 30 años por Kerr y col. (1972); las cuales incluyen pérdida de la unión celular, condensación cromosómica, fragmentación del ADN (cariorrhexis), dando fragmentos de peso molecular de 180 pb ⁽⁷⁰⁾ o detectados mediante marcaje específico (tinción de TUNEL), disminución del volumen celular, cambios en la organización de la membrana citoplasmática así como formación de cuerpos apoptóticos. En la apoptosis las alteraciones nucleares representan los cambios más significativos e importantes de la célula muerta y los organelos permanecen inalterados incluso hasta la fase en que aparecen los cuerpos apoptóticos. En la apoptosis destacan las alteraciones morfológicas del núcleo frente a las del citoplasma, a la inversa de lo que ocurre en la necrosis en general ⁽⁵³⁾.

Existen de manera general dos vías por las cuales se puede activar la apoptosis: la vía extrínseca y la vía intrínseca ^(7, 14, 18, 29). La vía intrínseca involucra a diversos miembros de receptores de membrana de la familia de TNF así como al ligando Fas. La unión del ligando al receptor resulta en la asociación de dominios de muerte del receptor con moléculas adaptadoras (FADD dominio de muerte asociado

a Fas) y la procaspasa 8, formando de esta manera el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). La activación de la caspasa 8 iniciadora puede conducir al procesamiento de caspasas efectoras tales como la caspasa 3 y 7 para finalmente concluir en la muerte por apoptosis de la célula. Además, esta vía puede incidir en la mitocondria a través de Bid, amplificándose de esta manera la señal. La vía intrínseca, involucra a la mitocondria, la cual además de ser la principal fuente de energía, también contiene numerosas proteínas proapoptóticas entre las que destacan el citocromo C. (Figura 9)

La homeostasis de la mitocondria es influenciada directamente por miembros de la familia de Bcl-2, entre los que se encuentra Bcl-2, Bax y Bim. La activación de Bax por un mecanismo dependiente de p53 ocasiona que Bax sea translocado del citosol a la membrana de la mitocondria y antagonice a Bcl-2, induciendo la liberación de citocromo C y otras proteínas apoptóticas.

El citocromo C liberado de la mitocondria junto con la proteína Apaf-1 y ATP facilitan la activación de la caspasa 9 que al hidrolizar substratos específicos, incluyendo a la procaspasa 3, ejecutan la muerte apoptótica ^(46, 30), la activación de la caspasa 3 induce el rompimiento proteolítico de sus substratos. Poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP), uno de los substratos específicos de la caspasa 3 esta involucrada en la reparación y mantenimiento genómico del ADN ⁽⁸⁵⁾.

El rompimiento de PARP es considerado como evidencia típica de apoptosis después de la exposición de las células tumorales a agentes quimioterapéuticos ⁽³³⁾.

Numerosos estudios muestran que la muerte celular por apoptosis puede ser dependiente de p-53 o independiente del arresto del ciclo celular en fase G1 y G2/M después del daño al ADN ^(14, 23, 62, 77).

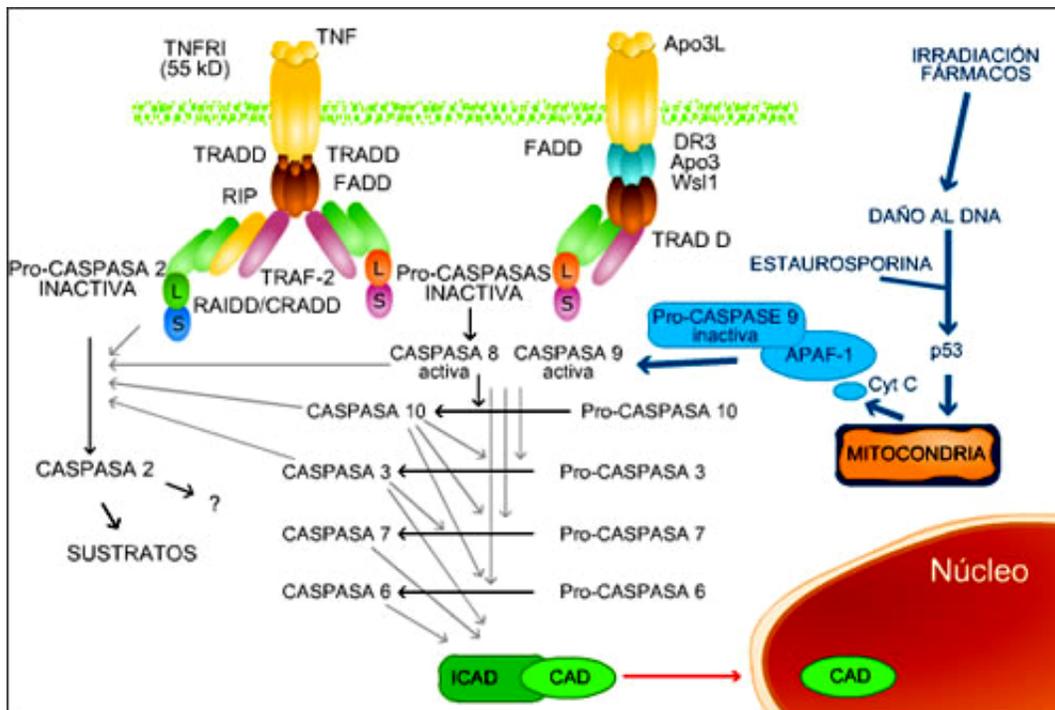


Figura. 9. Esquema general de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis ⁽⁸⁹⁾

En el laboratorio de investigación de Biología Molecular y Cáncer de la Facultad de Química, se llevó a cabo un programa de trabajo en conjunto con el departamento de farmacia para la obtención de nuevos compuestos con actividad citotóxica que puedan ser utilizados como fármacos antitumorales potenciales. Se analizan nuevos compuestos diferentes en estructura, diseñados y sintetizados por Lira Rocha, como posibles compuestos citotóxicos. A este respecto, el presente trabajo propone la evaluación citotóxica y potencial determinación de propiedades apoptóticas de esta serie de nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina.

8.0 HIPÓTESIS

Estudios previos han demostrado que moléculas con un núcleo tricíclico planar como la Amsacrina, son agentes citotóxicos con capacidad de intercalarse al ADN e inducir muerte celular de tipo apoptótica. Por lo que esta nueva serie de compuestos estructuralmente similares a la amsacrina, perteneciente a la familia de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina podrán tener actividad citotóxica y probablemente inducir fragmentación de ADN como rasgo sugerente de una muerte celular apoptótica en líneas celulares humanas.

9.0 OBJETIVOS

Con la finalidad de contribuir al descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes potenciales antitumorales, se realizó el presente trabajo:

9.1 Objetivo General

Evaluar el efecto en la inhibición de la proliferación celular de nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares humanas *in vitro*.

9.2 Objetivos Específicos

Determinar la IC₅₀ de los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares tumorales humanas: colon (SW680, SW480); cérvix (Hela, Calo); mama (MCF-7) y eritroleucemia (K562) mediante la prueba de reducción de MTT.

Seleccionar el derivado tiazolo[5,4-b]quinolina más activo para observar la posible inducción de fragmentación de ADN en la línea celular tumoral que resulte más sensible y mediante la técnica de TUNEL poder observar la inducción de muerte celular por apoptosis.

Realizar el análisis microscópico que permita observar los cambios morfológicos celulares que pudiesen inducir las nuevas tiazolo[5,4-b]quinolinas y su relación con el tipo de muerte celular.

10.0 MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

10.1.1 Medio de Cultivo

10.1.2 Medio D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium by Invitrogene.

(Carlsbad,CA BRL) ⁽¹⁵⁾

Medio D-MEM (Invitrogene, Carlsbad,CA)...1 sobre para disolver en 900 mL de agua.

Se suplementa con:

HEPES (SIGMA, St. Louis, MO).....	2.2 g
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃).....	3.7 g
Piruvato de Sodio (Invitrogene, Carlsbad,CA).....	10 mL
Aminoácidos no esenciales (Invitrogene, Carlsbad,CA).....	10 mL
Antibiótico antimicótico (INVITROGENE, Carlsbad,CA).....	10 mL
Suero Fetal Bovino Inactivado por Calor (INVITROGENE, Carlsbad,CA) (V/V).....	10 %

La adición de los componentes se lleva a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Se procede de la siguiente manera:

- a) En un vaso de precipitados de 1 L se agregan 700 mL de agua desionizada, después se añaden los componentes sólidos del medio en el siguiente orden:
 - Un sobre de medio D-MEM.
 - HEPES
 - Bicarbonato de sodio

Una vez que se han disuelto, se agregan los componentes líquidos:

- Piruvato
 - Aminoácidos no esenciales
 - Antibiótico-antimicótico
- b) La solución se agita hasta incorporación y disolución total de los componentes
 - c) Se ajusta el pH a 7.4 con soluciones estériles de HCl y NaOH.
 - d) Se lleva al aforo con agua desionizada a un volumen de 900 mL
 - e) La solución se esteriliza mediante filtración a través de membrana Millipore^{MR}, poro 22 ó 45 µm.

- f) Este medio estéril se complementa (según la cantidad a emplear) con suero fetal bovino inactivado por calor (SFB/INVITROGENE, Carlsbad, CA) al 10 % v/v*
- g) El control de esterilidad para el medio preparado se realiza colocando una alícuota en caja de Petri e incubación a 37°C, 99% HR y, 5% CO₂ durante 24 h, al término de dicho periodo de tiempo se observa al microscopio y, no se debe presentar desarrollo de microorganismo alguno.
- h) Una vez complementado el medio D-MEM, el tiempo máximo para su empleo es de un mes aproximadamente, en condiciones de refrigeración (4 °C.). El suero fetal bovino se inactiva previamente en baño María 30 minutos/56°C.

10.1.3 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS)

Para preparar 1 Lt.

KH ₂ PO ₄ (BAKER ^{MR}).....	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (BAKER ^{MR}).....	1.44 g
NaCl (BAKER ^{MR}).....	8.0 g
KCl (MERCCK ^{MR}).....	0.2 g

- a) Se disuelven los componentes en un vaso de precipitados de 1 L con agua desionizada
- b) Se ajusta el pH = 7.4
- c) Se esteriliza la solución en autoclave a 15 lb/in² durante 15 minutos.

10.1.4 Solución Salina Amortiguada por Fosfatos/Ácido Etilendiaminotetracético (PBS-EDTA)

Para preparar 1 Lt.

KH ₂ PO ₄ (BAKER ^{MR}).....	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (BAKER ^{MR}).....	1.44 g
NaCl (BAKER ^{MR}).....	8.0 g
KCl (MERCCK ^{MR}).....	0.2 g
Ácido etilendiaminotetracético (EDTA J.T.BAKER ^{MR})..	0.372 g

- a) Se disuelven los componentes en un vaso de precipitados de 1 L con agua desionizada.
- b) Se ajusta el pH = 7.4
- c) Se afora a 1.0 L con agua desionizada y se mezcla.
- d) Se esteriliza la solución en autoclave a 15 lb/in² durante 15 minutos.

10.1.5 Solución MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

Nota: Usar guantes y cubre boca para la preparación de la solución.

- a) La solución se prepara a una concentración de 2.5 mg/mL.
- b) Se prepara con solución PBS estéril, por lo cual es necesario trabajar en la campana de flujo laminar y el material para pesar debe estar limpio y seco a la flama.
- c) Se conserva en refrigeración (2-4 °C), protegido de la luz, bajo estas condiciones es estable por un periodo aproximado de un mes.

10.1.6 p- Formaldehído al 4%

Las técnicas histológicas comprenden la preparación del tejido para su estudio microscópico sometándolo a una serie de procesos como la fijación, la cual busca preservar el estado natural de las células en cuanto a su estado físico y parcialmente a su estado químico. La mayoría de los fijadores actúan desnaturalizando o precipitando proteínas, formando una malla que engloba a los otros componentes de la célula. El grupo aldehído (H-CHO) permite reacciones numerosas y complejas con los componentes tisulares, su acción polimerizante, forma compuestos y complejos de adición creando ligaduras entre moléculas proteicas, que pueden ser reversibles por acción de los lavados con agua. El p -formaldehído forma monómeros de formol, penetra bastante bien a los tejidos y no los endurece demasiado ni los hace quebradizos ⁽⁴⁴⁾.

La preparación de p-formaldehído al 4% se lleva a cabo en campana de flujo laminar y con agua destilada. Se favorece su disolución a una temperatura de

aproximadamente 56 °C. En algunos casos si para su uso no interfiere, se pueden agregar gotas de NaOH para favorecer la disolución.

Es una solución amortiguada de 4 g de p-formaldehído por 100 mL de PBS a pH 7.4 (ajustado potenciométricamente) y se debe almacenar en refrigeración (4°C).

10.2 Medios de Congelamiento

10.2.1 Medio I. Para líneas celulares : HeLa, CaLo, K-562, SW480 y SW620.

En un recipiente estéril se adiciona el medio de cultivo estéril sin complementar con SFB.

A dicho medio se agrega glicerol estéril de tal forma que quede a una concentración de 15 % v/v y, se mezclan homogéneamente.

Este medio se almacena a –20 °C, y cuando sea requerido se descongela y emplea tan pronto como sea posible.

10.2.2 Medio II. Para la línea celular: MCF-7.

Este medio esta constituido por:

Dimetilsulfóxido (DMSO Mallinckrodt) a concentración 8% v/v en Suero fetal bovino inactivado por calor (SFB INVITROGENE, Carlsbad, CA)

La solución resultante de esta mezcla se almacena en recipientes estériles a -20°C.

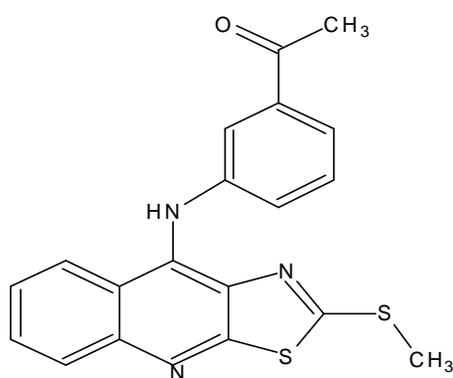
11.0 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS.

Las líneas celulares se obtuvieron de la colección del Laboratorio de Biología Molecular B-202 de la Facultad de Química, todas fueron propagadas en medio D-MEM Dulbecco's preparado como se describió anteriormente e incubadas en atmósfera húmeda (5% CO₂ 95% aire, 95% HR) a 37°C en una incubadora modelo Forma Scientific® 3110; y se emplearon para los ensayos de citotoxicidad las siguientes seis líneas obtenidas del ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD):

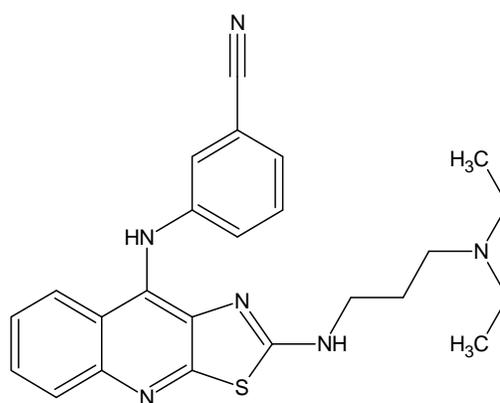
1. Hela; Adenocarcinoma de cérvix epitelial adherente.
2. SW480; Adenocarcinoma colorrectal
3. SW620; Metástasis de adenocarcinoma colorrectal
4. Calo; Adenocarcinoma de cérvix.⁽⁶³⁾
5. MCF-7; Adenocarcinoma de glándula mamaria.⁽⁷²⁾
6. K562; Aislada de una paciente en crisis blástica de leucemia mielógena crónica. Con cambios marcados mieloides y eritroides (Eritroleucemia).⁽⁴¹⁾

12.0 Estructura química de los 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina evaluados.

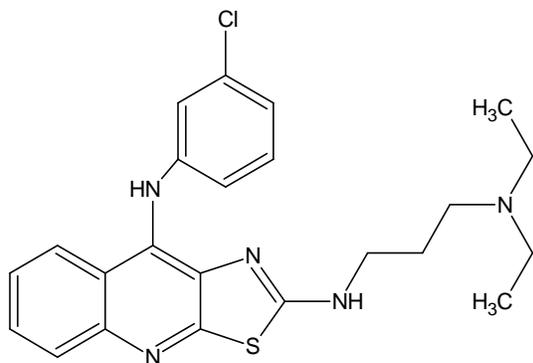
Cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas sintetizados por Lira y colaboradores utilizados en el presente trabajo, se presenta su estructura molecular, nombre químico y código de identificación asignado por el laboratorio donde se sintetizaron. Para fines de éste trabajo se denominaran Compuesto I, II, III y IV como se describe a continuación: ⁽⁴⁰⁾



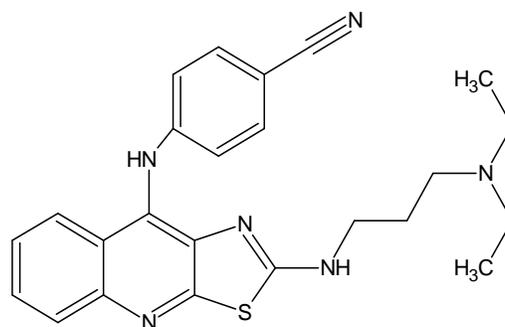
I). 1-[3-(2-metilsulfanil-tiazolo[5,4-b]quinolin-9-ilamino)-fenil]-etanona



II). 3-[(2-[(3-(dietilamino)propil]amino)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-il)amino]benzonitrilo



III). 3-[(2-[(3-(dietilamino)propil]amino)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-il)amino]clorofenol



IV). 4-[(2-[(3-(dietilamino)propil]amino)[1,3]tiazolo[5,4-b]quinolin-9-il)amino]benzonitrilo

13.0 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

13.1 PRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Se basa en un congelamiento fraccionado a -20°C por 2h., -70°C 2h y a -191°C en nitrógeno líquido hasta su utilización; con la finalidad de preservar las líneas celulares en condiciones óptimas se recomienda una manipulación muy cuidadosa.

13.1.1 Material y soluciones:

1. Tubos para criopreservación.
2. Suero fetal bovino inactivado (INVITROGENE, Carlsbad,CA)
3. Medio de congelamiento
4. PBS-EDTA
5. Pipetas estériles de 10 mL
6. Pipetas estériles de 5 mL
7. Pipetas Pasteur estériles
8. Tubos para centrifuga estériles (FALCON^{MR})

Se procede de la siguiente forma y bajo condiciones de esterilidad:

- a) Se da un primer lavado con PBS-EDTA a cada la línea celular contenida en la caja Petri. (aprox. 5 mL), previa eliminación del medio de cultivo por decantación; cada lavado debe ser rápido y en un solo movimiento.
- b) Se lava por segunda vez con la misma solución empleando un volumen aproximado de 3 mL y se incuba por 10 minutos a 37°C , 99% HR y, 5% CO_2 .
- c) Transcurrido este tiempo se ha favorecido el desprendimiento de las células del plástico de la caja, entonces se cosechan de la caja(s) con la ayuda de una pipeta Pasteur ó micropipeta en un tubo FALCON^{MR} (previamente etiquetado), y se centrifuga la suspensión celular a 1500 r.p.m, por 10 minutos.

- d) Se desecha el sobrenadante y el botón celular es resuspendido con pipetas Pasteur en 4 mL de medio de congelamiento.
- e) Una vez que se tiene una suspensión homogénea se colocan alícuotas de 1.5 mL en los criotubos, los cuales se mantienen por 1 hora a -20 °C, a -70 °C/2 horas y, a -190°C se conservan en nitrógeno líquido.

13.2 CONTEO CELULAR

El conteo celular se lleva a cabo con la ayuda de una cámara de Neubauer o hemocitómetro.

Una vez cosechadas las células de las cajas de Petri en condiciones de esterilidad, se coloca una pequeña alícuota homogénea que llene la cámara, la cual es un porta objetos con una depresión en el centro, en el fondo tiene marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen (Figura 10).

Es un cuadrado de 3x3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues, en la figura 6, el área sombreada y marcada como “L” corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubre objetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubre objetos éste dista de la superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie “L” y el cubre objetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 μL ⁽⁸⁸⁾.

Cada cuadrado de la cámara, con el cubre objetos bien colocado, representa un volumen total de 0.1 mm^3 o 10^{-4} cm^3 . Este es el factor de conversión del hemocitómetro.

Dado que 1 cm^3 es aproximadamente 1 mL, la subsecuente concentración celular por mililitro y el número total de células se determinó mediante los siguientes cálculos:

- 1) Células/mL= (cuenta promedio de los cuadrantes) x (factor de dilución) x (10^4)
- 2) Total de Células = (cél./mL) x (volumen original o de pre dilución) ⁽⁶⁰⁾

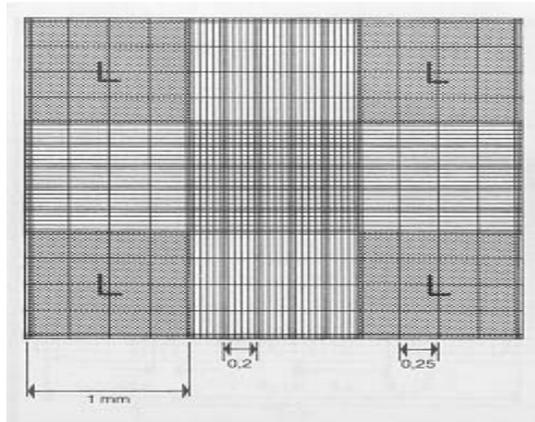


Figura 10. Cámara de Neubauer.

En la imagen se puede observar el aspecto de una de las regiones marcadas como "L" y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado.

Una vez que se conoce la alícuota a tomar para tener el número de células/mL/pozo deseado, se coloca dicho volumen en cada pozo de la caja de 96 pozos bajo condiciones de esterilidad, el volumen final debe ser de 200 μ L, seguido de movimientos suaves de la caja en forma de ocho lo que propicia un crecimiento homogéneo de la distribución de las células y, se incuban en las condiciones antes mencionadas por un lapso de 24 h, previo al tratamiento con los compuestos mediante el ensayo de MTT.

13.3 INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. REDUCCIÓN DEL MTT

Técnica colorimétrica del MTT propuesta por Mossman en 1983 ⁽⁴⁹⁾; modificada por Carmichael en 1985 ^(11, 12, 60), el MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un compuesto de color amarillo que es reducido por las deshidrogenasas principalmente mitocondriales de las células viables, formando un precipitado de color azul llamado formazán (Figura 11), especificada en la siguiente reacción:

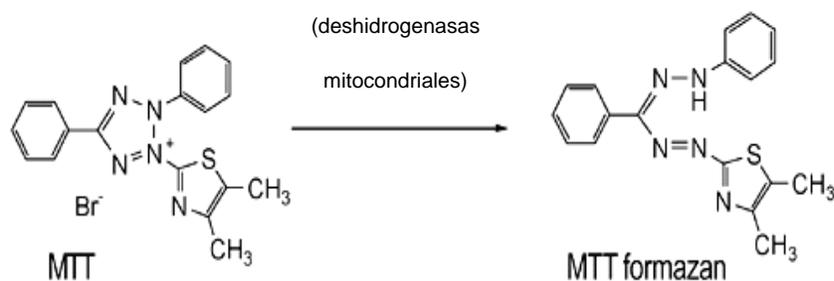


Figura 11. Reacción de reducción del MTT.

El número de células vivas es directamente proporcional a la producción de formazán, el cuál al ser solubilizado en dimetilsulfóxido (DMSO), puede ser medido espectrofotométricamente (550 nm). Las medidas de sensibilidad *in vitro* a un compuesto por el método de la reducción de la sal de tetrazolio han mostrado tener correlación con las determinaciones experimentales hechas por otros métodos, como el de exclusión de azul tripano, sulforrodamina y cristal violeta.

Por otro lado, los derivados tiazolo[5,4-b]quinolinas solubilizados en DMSO, serán preparados en soluciones stock, para obtener diluciones seriadas con las diferentes concentraciones micro molares (5, 10, 20, 40 y 80 μM) de los cuatro nuevos derivados: Compuesto I (Código: B3KTN), Compuesto II (Código: D3CNP), Compuesto III (Código: D3CLP) y Compuesto IV (Código: D4CNP). (Tabla 3).

Lo primero que se realizará es la cosecha de las líneas celulares, se inoculan en placas de 96 pozos (tipo ELISA) a una densidad de 6.5×10^3 cel/pozo en fase de crecimiento logarítmico procediendo como se describe en el apartado de conteo celular; a las 24 horas se debe adicionar las diferentes soluciones stock de los compuestos a evaluar, lo mismo que un control disolvente (DMSO, 0.6%) y control positivo de inhibición de la proliferación celular, en este caso se utilizará Paclitaxel (Taxol, 0.25 μM), de tal modo que el volumen final sea 250 μL . Después de las 48 horas de incubación a 37°C, 5% CO₂ y en atmósfera húmeda, añadir la solución de MTT (2.5 $\mu\text{g/mL}$) en un volumen de 20 μL a cada pozo y dejar incubar por 4 horas, una vez transcurrido este tiempo, se debe desechar esta solución por decantación vigorosa y añadir 200 μL de DMSO a cada pozo seguido de una agitación suave para favorecer la disolución del formazán que se hubiese producido, luego entonces,

determinar la absorbancia en un espectrofotómetro de micro placas (Beckman Dur-64), a una longitud de onda de 540 nm.

El porcentaje de inhibición del crecimiento celular (%CI), se calcula mediante la fórmula:

$$\%CI = ([1 - \text{absorbancia de las células tratadas}] / [\text{absorbancia de células sin tratar}]) \times 100$$

Cada ensayo se debe realizar tres veces y por sextuplicado. Una vez que se calcula el porcentaje de inhibición de crecimiento celular, emplear el software OriginPro versión 7.0 de OriginLab Data Analysis and Graphing Software, disponible en el laboratorio, para determinar el valor de concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) de los cuatro nuevos derivados en cada línea celular.

13.4 DETERMINACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN POR LA TÉCNICA DE TUNEL (TdT-MEDIATED dUTP NICK END LABELING)

Dado que la fragmentación es una prueba que sugiere que el tipo de muerte celular es por apoptosis, llevar a cabo la técnica de marcaje de extremos 3`-OH libres originados por apoptosis o técnica de TUNEL. Este marcaje se realiza con la adición de nucleótidos marcados con fluoresceína mediante una desoxinucleotidil transferasa.

Para evaluar el efecto biológico del compuesto que resulte más activo en la inhibición de la proliferación, se planteó analizar su efecto en la integridad del ADN, evaluar el grado de fragmentación, la cual es sugerente de que la muerte celular es llevada a través de un proceso apoptótico ⁽³⁾.

Nota: En el presente trabajo se emplearon las líneas celulares HeLa (por ser la línea celular más sensible al compuesto) y K-562 (por ser la línea celular de leucemia, principal tipo de cáncer asociado a la terapia de inhibidores de topoisomerasa II), empleando el Kit comercial de revelación de fragmentación de ADN: In Situ Cell Death Detection, Roche. ^(21,67)

Las líneas celulares se deben incubar a una densidad de 1x10⁶ células en cajas de 10 cm de diámetro en la que previamente se han colocado en toda su superficie cubre objetos redondos y estériles, sobre los cuales se desarrollará el cultivo celular durante 24 horas, las células se exponen al compuesto al valor de

IC_{50%} determinada, a tiempos de 12, 20, 36 y 44 horas. Como control disolvente se emplean células expuestas a DMSO (0.6% v/v), como control positivo de inhibición celular, se exponen a Taxol (0.25 µM) y un control sin tratamiento, así como los controles positivo y negativo de la técnica. Al término de la exposición al compuesto, el medio de cultivo se retira y las células se lavan cuidadosamente con PBS frío el cual también debe ser retirado, enseguida se fijan las células agregando una solución de p-formaldehído al 4% en PBS durante una hora a temperatura ambiente.

Se retira el p-formaldehído y se lavan las células con PBS frío; la caja de cultivo se sella con parafilm® y se conserva en refrigeración para su posterior procesamiento.

Procedimiento para la técnica de TUNEL:

Las células fijadas sobre los cubre objetos se lavan con PBS a temperatura ambiente. Se permeabilizan en una solución al 0.1% de Tritón X100 en 0.1% de Citrato de Sodio (JT Baker^{MR}) durante 2 min., sobre una superficie de hielo. Una vez permeabilizadas las células se lavan con PBS.

Para el control negativo de la técnica se debe designar un cubre objetos con células que serán tratadas con el buffer de reacción que marca al ADN fragmentado carente de la enzima deoxinucleotidil transferasa.

Para el control positivo de la técnica se exponen células sin tratamiento a una solución de 1 µg/mL de ADNasa I (Invitrogene) durante 10 min. a temperatura ambiente para inducir fragmentación y se lava con PBS.

Como control positivo de fragmentación inducido por un compuesto, se utilizan las células tratadas con 0.25 µM de Taxol.

Tanto las células tratadas con el derivado de tiazolo[5,4-b]quinolina como las tratadas con Taxol y aquellas digeridas con ADNasa I se deben exponer con la mezcla de reacción de TUNEL, excepto las células del control negativo las cuales solo se exponen con el amortiguador de reacción carente de la enzima deoxinucleotidil transferasa. Todas se incuban durante una hora a 37°C en cámara húmeda. Después de la incubación se lavan en dos ocasiones con PBS y se coloca el cubre objetos sobre un porta objetos con medio de montaje (DakoCytomation Carpintería, CA, USA) para microscopía de fluorescencia, de tal forma que la capa celular estuviera en contacto con dicho medio.

Las muestras se observan en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse^{MR}).

13.5 TINCIÓN CON HEMATOXILINA/EOSINA

13.5.1 Morfología Celular

Para observar el efecto en la morfología inducido por los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en células tumorales humanas (seleccionar la(s) más(s) sensible), se llevará a cabo la tinción con hematoxilina/eosina. Las células se deben incubar a una densidad de 1×10^6 células/cajas de 10 cm de diámetro, a la que previamente se le debe haber colocado en toda su superficie cubre objetos redondos estériles para así desarrollar el cultivo celular sobre los mismos durante 24 horas, las células se exponen entonces al compuesto (concentración $IC_{50}=10 \mu M$) a tiempos de 12, 20, 36 y 44 horas, como controles se emplearán células sin tratamiento, control disolvente (DMSO) y control positivo de inhibición (Taxol a una concentración de $0.25 \mu M$.)

Se procede de la siguiente manera:

- a) Las células se fijan con p-formaldehído al 4% como se indicó en la técnica de TUNEL.
- b) Se lava con PBS frío en dos ocasiones durante 5 min. c/u
- c) Se lava con agua destilada, 5 min.
- d) Las células se tiñen con hematoxilina durante 4 min. y se lavan con agua desionizada en varias ocasiones.
- e) Se tiñen las células con eosina durante 6 min.
- f) Se lava en tres ocasiones con etanol absoluto con 1 mL aprox. Lo más rápido posible.
- g) Se hacen pasar por un proceso de deshidratación de etanol a concentraciones de 70%, 80%, 96% y 100%, empleando 2 mL, por 2 minutos para cada una de ellas y en ese orden, posteriormente se lavan con agua desionizada.
- h) Los cubre objetos se sumergen en una mezcla 1:1 de Etanol-Xilol y/o Xilol (2 veces), previo a su montaje sobre el porta objetos, utilizando resina Clarión®.
- i) Las preparaciones se observan en un microscopio de luz ⁽⁴⁴⁾.

14.0 RESULTADOS

14.1 Evaluación de la actividad citotóxica mediante la técnica colorimétrica de MTT y determinación de la IC_{50%} para los compuestos I, II, III y IV en seis líneas celulares tumorales humanas.

Con los resultados obtenidos de porcentaje de inhibición de la proliferación celular (tabla 3), se procedió a determinar el valor de IC_{50%} de la proliferación celular utilizando para ello una regresión de tipo no lineal, específicamente de tipo sigmoideal, aplicando la ecuación de Boltzman con la ayuda del Software Origin V.7.0. de OriginLab Data Analysis and Graphing Software

Con base en estos resultados se observa que los compuestos con el sustituyente N,N-propildietilamino en el carbono 3 del anillo de tiazolo[5,4-b]quinolina, en general son los más activos (Figura 12 y Figura 13); es decir, el compuesto II, compuesto III y compuesto IV, en comparación con el compuesto I, que contiene un sustituyente tipo metiltilio. De entre los compuestos con el sustituyente NH-propildietilamino se observa que el compuesto con la mayor actividad citotóxica no sólo para la línea celular K-562 sino también para las otras cinco líneas, es el compuesto III, que tiene en el anillo de anilina el grupo funcional Cloro (Cl) en el carbono 3 como se muestra en la tabla 3.

Por lo que se evidencia una posible relación estructura – actividad , que queda de manifiesto al observar otros compuestos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina que contienen un grupo funcional alquilamino, los cuales tienen una menor actividad posiblemente por que la longitud de ésta cadena permita una mayor incorporación a través de la membrana citoplasmática ⁽⁴⁰⁾.

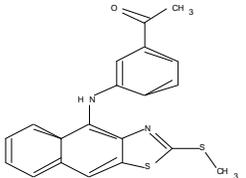
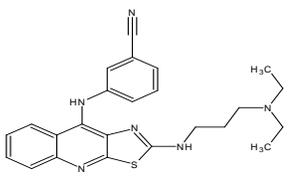
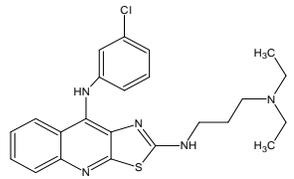
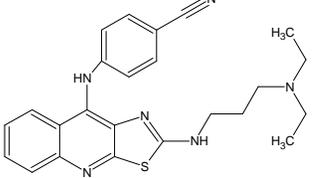
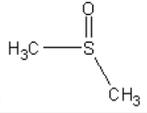
(Compuesto)/Código	Línea Celular/ Estructura	K-562	CaLo	MCF-7	HELA	SW480	SW620
(I) B3KTN Mín: ND Máx: ND		*	*	*	*	*	*
(II) D3CNP Mín: 11.53 μ M Máx: 19.65 μ M		12.88 \pm 3.59	16.49 \pm 5.64	17.47 \pm 3.07	19.21 \pm 0.78	11.53 \pm 3.59	19.65 \pm 0.002
(III) D3CLP Mín: 7.46 μ M Máx: 12.88 μ M		9.94 \pm 5.18	12.88 \pm 12.54	9.72 \pm 3.41	7.46 \pm 1.36	7.91 \pm 2.07	10.17 \pm 0.022
(IV) D4CNP Mín: 12.88 μ M Máx: 29.15 μ M		12.88 \pm 9.49	28.02 \pm 12.54	20.56 \pm 6.67	24.18 \pm 4.36	22.70 \pm 2.81	29.15 \pm 5.91
DMSO(-): (Dimetilsulfóxido)		0.76 \pm 1.66	2.56 \pm 3.19	3.08 \pm 9.05	2.48 \pm 11.68	3.64 \pm 11.98	3.20 \pm 2.64

Tabla 3 Citotoxicidad (IC₅₀, μ M) de los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares humanas.
 (*): La concentración más alta del compuesto empleada fue de 80 μ M, sin embargo, el compuesto I a dicha concentración no fue posible determinar la CI_{50%}; lo que significa que se requiere de mayor concentración para poder determinar dicho valor.
 Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y se muestran con su valor de coeficiente de variación (\pm CV).
 (-): Solvente, sin actividad citotóxica a concentración de 0.6%

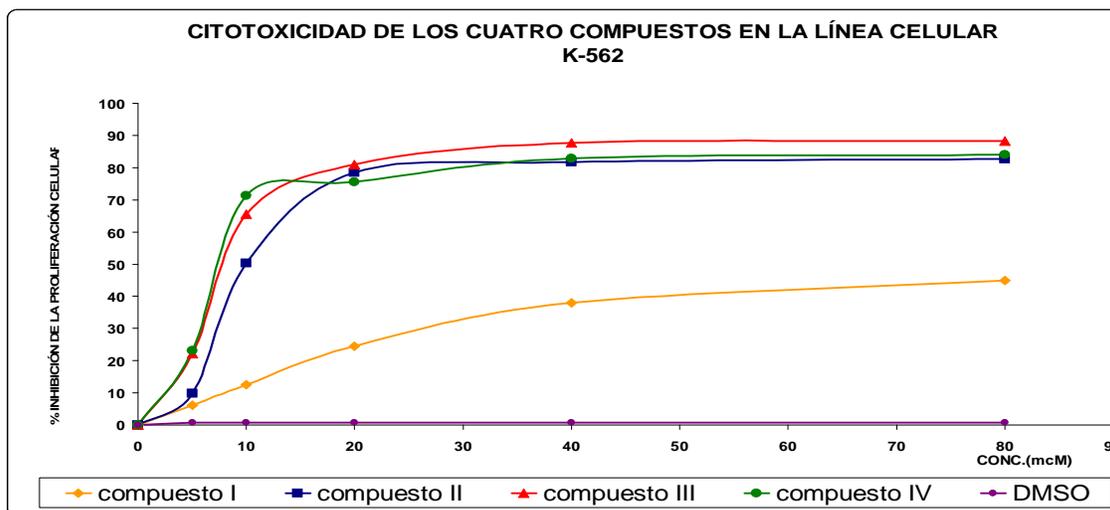
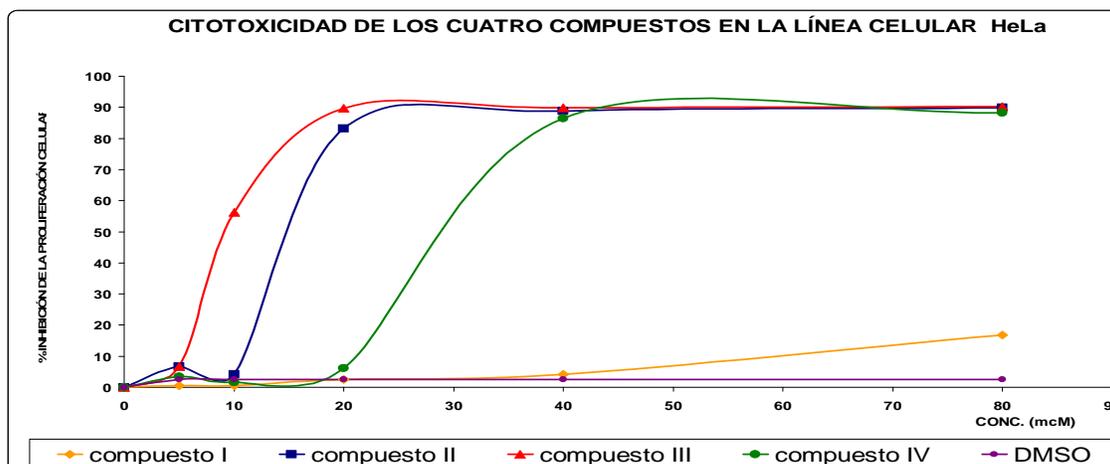
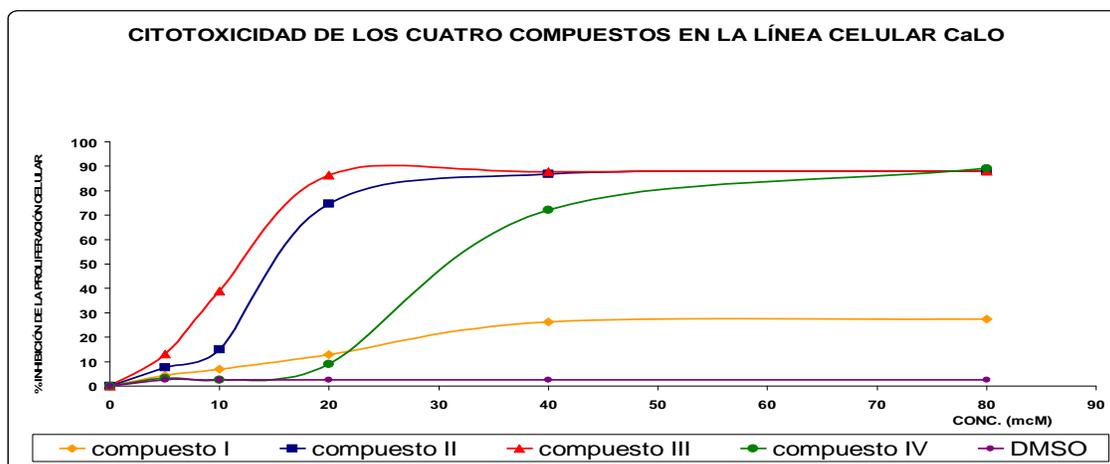


Figura 12. Porcentaje de inhibición de la proliferación de las líneas celulares tumorales: CaLo, Hela y K-562, tratadas con los cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina a diferentes concentraciones (μM) durante 48h de exposición. Se muestra el control basal del disolvente DMSO ($0.6 \mu\text{M}$). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y realizados por sextuplicado.

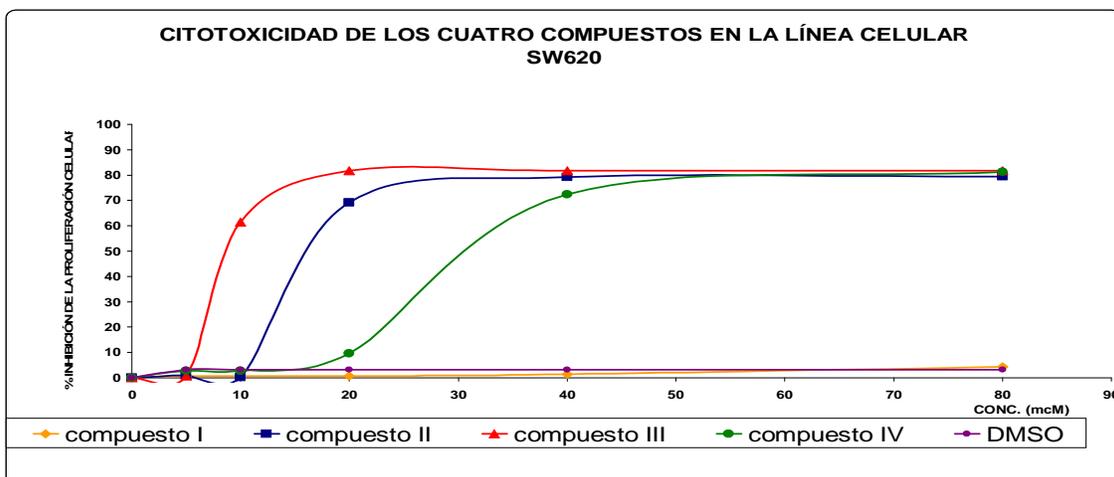
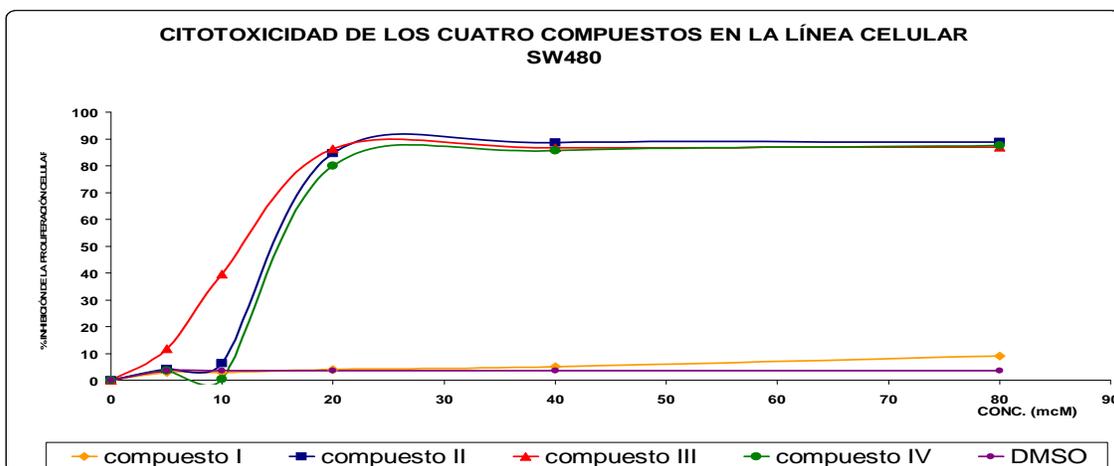
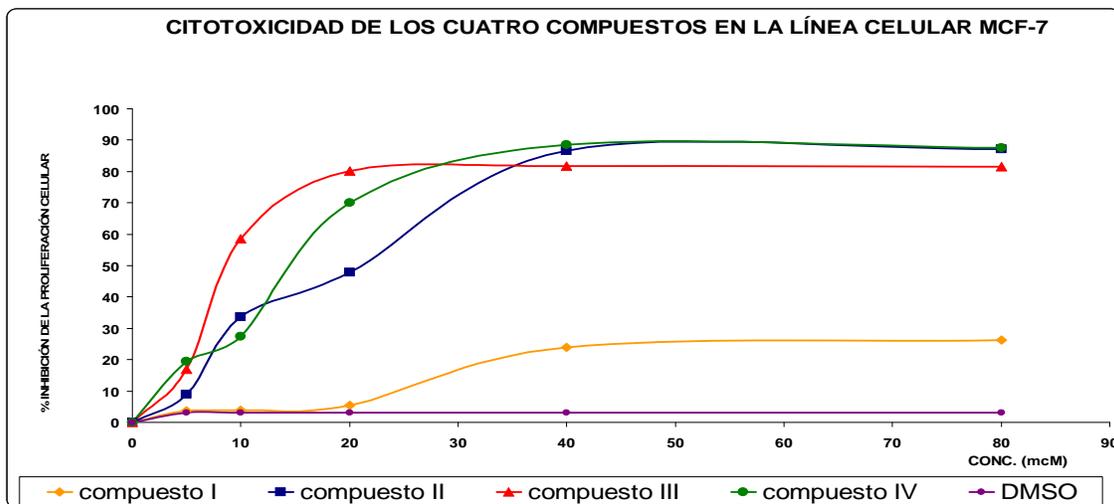


Figura 13. Porcentaje de inhibición de la proliferación de las líneas celulares: MCF-7, SW-480 y SW-620, tratadas con los cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina a diferentes concentraciones (μM) durante 48h de exposición. Se muestra el control basal del disolvente DMSO (0.6 μM) Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes y realizados por sextuplicado.

El compuesto con la mayor actividad citotóxica (mayor inhibición celular a menor concentración) fue el compuesto III, cuya característica es el grupo cloro (-Cl) en el carbono C-3 del sustituyente de anilina y una cadena dietilpropilendiamina en el núcleo de tiazoloquinolina, que esta en la posición 9 del anillo de tiazolo[5,4-b]quinolina con un valor de $IC_{50\%}$ de 7.46 μ M sobre la línea celular HeLa.

En cuanto a los compuestos II y IV que solo difieren en el grupo ciano (-CN) en las posiciones de carbono C-3 y C-4, respectivamente, su citotoxicidad estuvo en un rango de 11.53 a 19.65 μ M y 12.88 a 29.15 μ M para cada caso (Tabla 3).

Para el compuesto I con un grupo carboxilo (-OCCH₃) en el carbono C-3 del anillo de tiazolo[5,4-b]quinolina y que difiere de los otros tres derivados en que la cadena lateral es corta de tipo metil-tio, presentó una baja toxicidad, no observándose la CI_{50} a la concentración máxima empleada de 80 μ M.

Con estos resultados es de inferirse que existe una estrecha relación en cuanto a la estructura – actividad citotóxica de la modificación de esta nueva serie de compuestos.

Para poder determinar la sensibilidad de alguna línea celular hacia algún derivado se hizo la comparación entre los mismos para cada línea celular que se utilizó; encontrándose en la mayoría de los casos que la línea K-562 de leucemia fue la mas sensible al compuesto III (con el grupo Cl en C-3), seguido del compuesto II como se observa en la figura 14.

Así mismo se observó que de las líneas celulares evaluadas, la línea K-562 de leucemia fue la más sensible a los 4 compuestos y en particular todas las líneas fueron más sensibles al compuesto III, seguido del compuesto II. Figura 13 y tabla 3.

Para poder determinar la sensibilidad de alguna línea celular hacia los nuevos derivado se hizo la comparación del efecto en el porcentaje de inhibición de cada compuesto respecto de las seis líneas celulares, como lo muestra la figura 15.

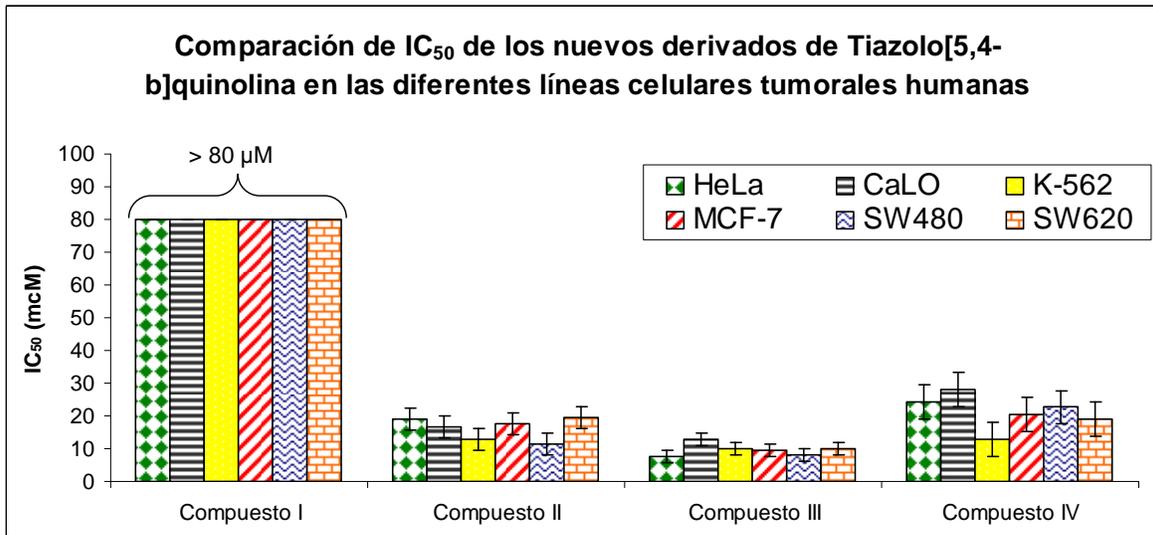


Figura 14. Valores de IC_{50%} obtenidos en la prueba de reducción de MTT de los cuatro derivados para cada una de las líneas celulares tumorales humanas empleadas. Para el compuesto I no se observó la IC_{50%} en el rango de concentraciones evaluado. Los resultados son el valor promedio obtenido ± D.E., por triplicado.

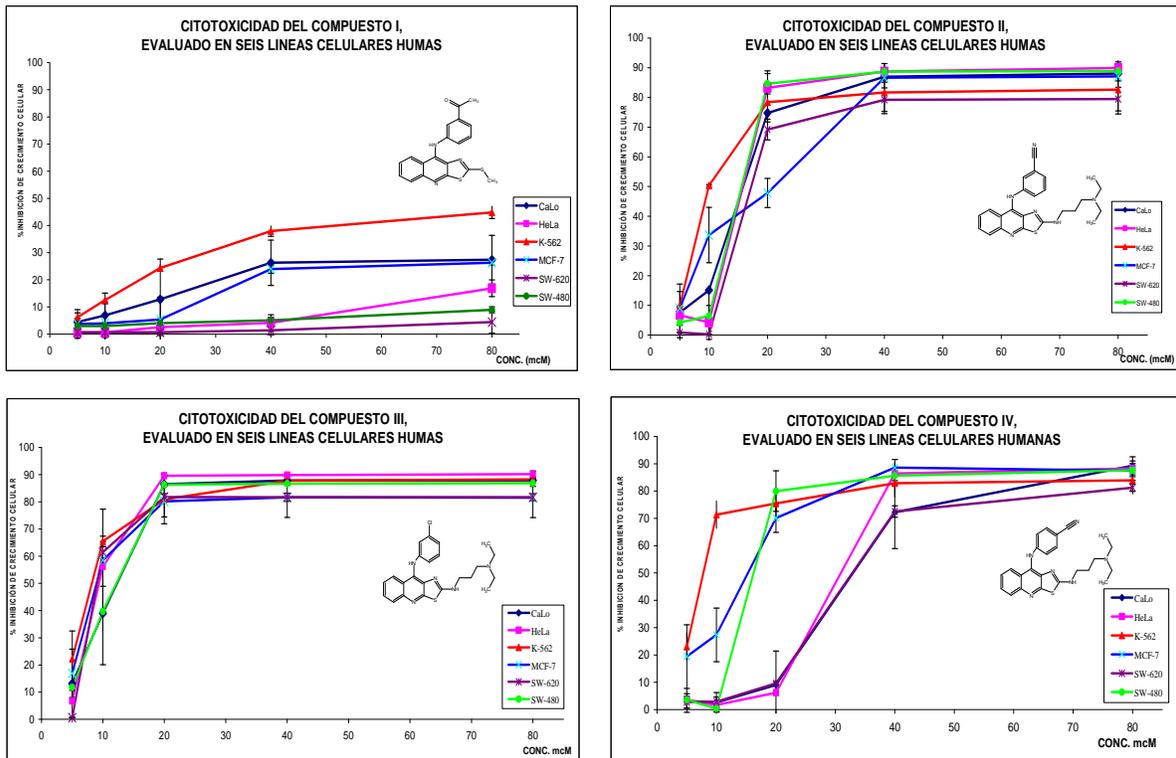


Figura 15. Citotoxicidad del compuesto I, II, III y IV en las seis líneas celulares tumorales humanas. Los resultados de cada determinación son el promedio ± D.E. por sextuplicado.

14.2 ENSAYO DE TUNEL

Las líneas celulares empleadas fueron HeLa y K-562 (Figura 16 y 17), previa exposición al compuesto III, que presentó la mayor actividad, la concentración empleada en ambos casos fue la IC₅₀ que fue de 10 µM. Los resultados muestran que tanto la línea celular HeLa como K-562 que fueron expuestas al compuesto III presentan fragmentación de su ADN desde las primeras 12 horas de tratamiento. La exposición a Taxol revela fragmentación similar al compuesto III, también a partir de las 12 primeras horas de exposición y se hace más evidente la fragmentación a las 20 horas de exposición como ocurre con el compuesto III. La fragmentación se logra observar debido al marcaje fluorescente de color amarillo-verdoso intenso, en donde al microscopio se aprecia la condensación de cromatina nuclear. También se ven fragmentos celulares que muy probablemente sean cuerpos apoptóticos en mayor proporción para el compuesto III que para el Taxol y el control disolvente, esto puede ser atribuido a una mayor sensibilidad de la línea celular tumoral por el compuesto III, haciéndolo más tóxico en el periodo de tiempo y concentración evaluado, lo que no necesariamente quiere decir que es más eficaz que el Taxol, ya que éste se encuentra en menor concentración que el compuesto III. Los resultados se muestran en las figuras 15 y 16 para el tratamiento de ambas líneas.

Fragmentación de ADN inducido por el compuesto III en la línea celular HeLa (Aumento 20X).

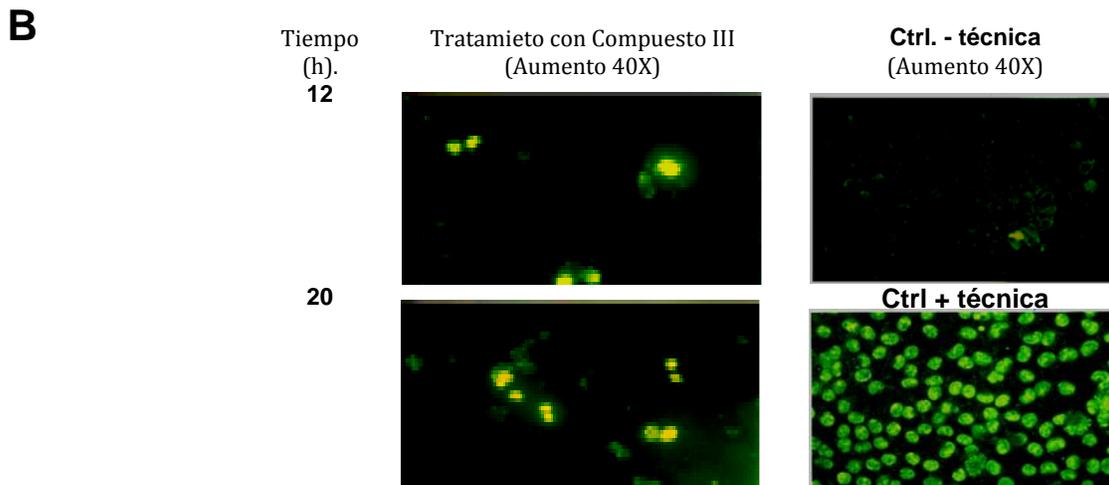
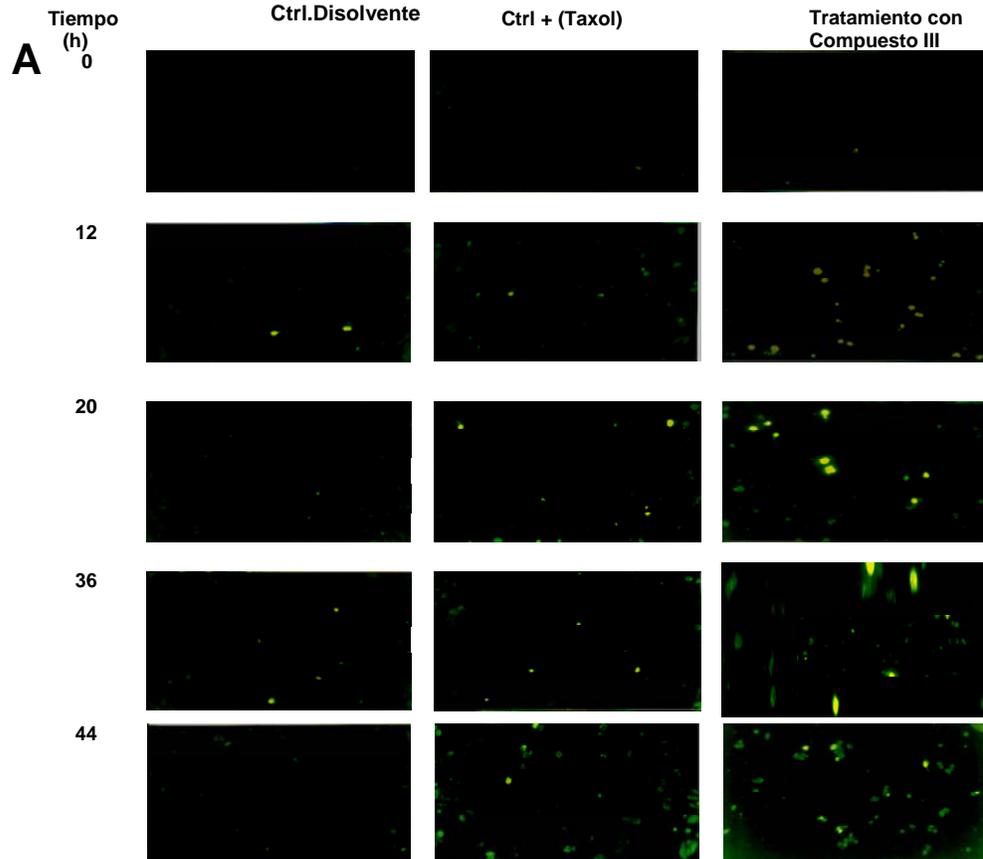


Figura 16. (A): Observación al microscopio con aumento 20X de tinción mediante técnica de TUNEL en línea celular HeLa. Control disolvente DMSO (0.6%), Control positivo: Taxol (0.25 μ M), compuesto III (10 μ M). Se observa la inducción de fragmentación de ADN en las primeras 20h de exposición al fármaco, así como también la formación de cuerpos apoptóticos. (B): Observación al microscopio aumento 40X del tratamiento con el compuesto III en comparación con la tinción control del kit de la técnica de TUNEL, el control negativo no contiene la enzima terminal transferasa, mientras que el control positivo de células del kit si la contienen, como se observa en la imagen. Los resultados mostrados en ésta figura son representativos de tres experimentos independientes.

Fragmentación de ADN inducido por el compuesto III en la línea celular K-562 (20X).

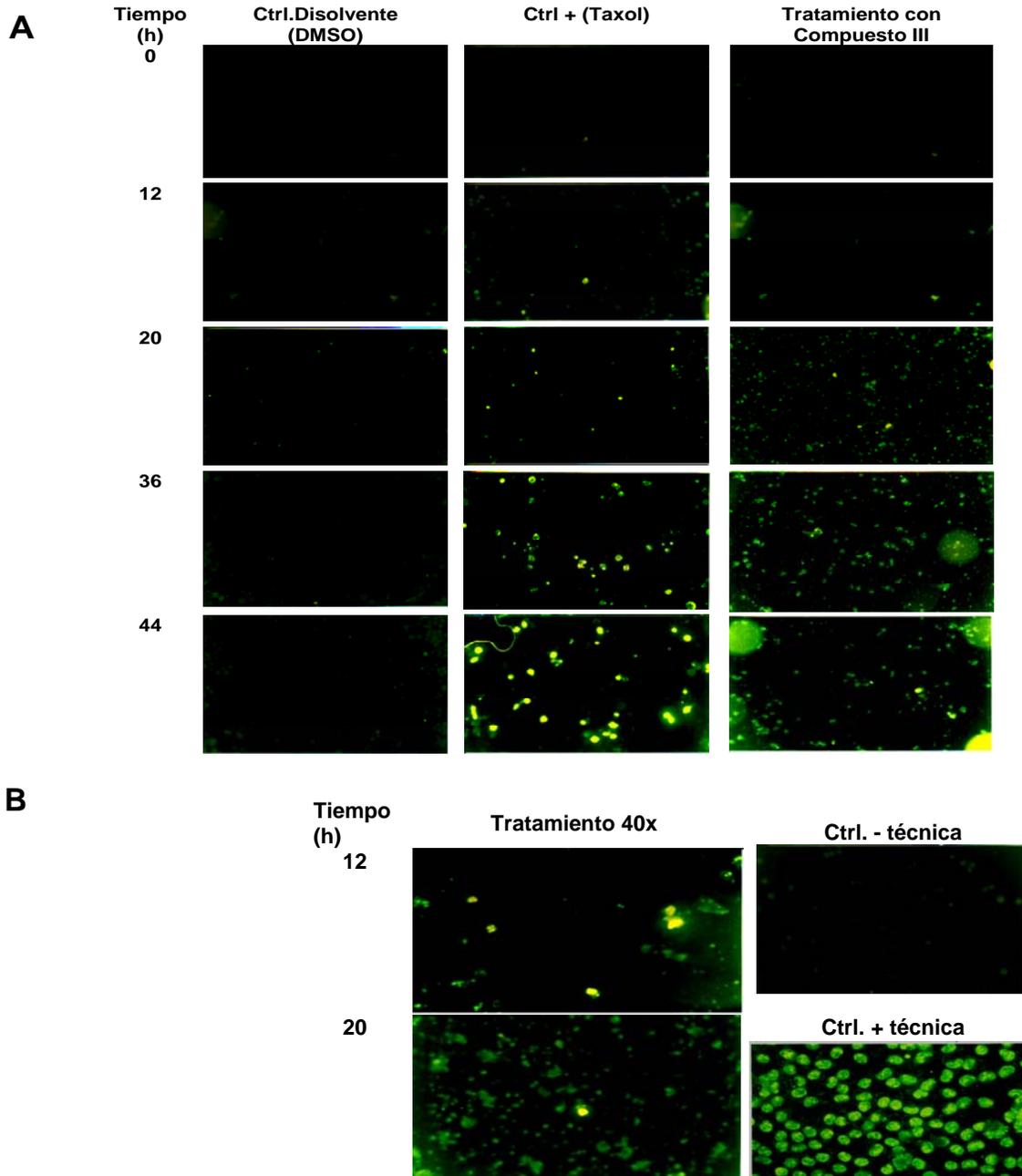


Figura 17. (A): Observación al microscopio con aumento 20X de tinción mediante la técnica de TUNEL en línea celular K-562. Control disolvente DMSO (0.6%), control positivo: Taxol (0.25 μM), Compuesto III (10 μM). Se observa la inducción de fragmentación de ADN en las primeras 20h de exposición al fármaco, así como también la formación de cuerpos apoptóticos. (B): Observación al microscopio con aumento 40X del tratamiento con el compuesto III en comparación con la tinción control del kit de la técnica de TUNEL, el control negativo no contiene la enzima terminal transferasa, mientras que el control positivo de células del kit si la contienen como se muestra en la imagen. Los resultados mostrados en ésta figura son representativos de tres experimentos independientes.

14.3 MORFOLOGÍA CELULAR

El examen microscópico de la línea celular HeLa se llevó mediante tinción con eosina/hematoxilina que como complemento a la técnica de TUNEL, mostró una marcada alteración en la morfología de su membrana nuclear y citoplasmática en las primeras 20 horas; después se fue perdiendo la adhesión celular, se observó condensación de la cromatina, formación de posibles cuerpos apoptóticos de manera generalizada en las seis líneas celulares, de lo que se podría sugerir que el compuesto III induce una muerte tipo apoptótica.

Al microscopio de luz, estas posibles células apoptóticas se observaron como células pequeñas, hipereosinófilas, de citoplasma redondeado u oval con o sin material nuclear basófilo. El citoplasma en fases más avanzadas aparece disminuido, que varían de tamaño considerablemente. La cromatina aparece como masa densa hiperbasófila.

En el citoplasma hay agregación de filamentos intermedios apenas perceptibles, formación de grumos de lo que seguramente podrían ser proteínas ribosomales, agrupación concéntrica de retículo endoplásmico rugoso, las células con abundante citoplasma forman prolongaciones muy prominentes. Finalmente se observa que estos organelos se separan para formar los fragmentos denominados cuerpos apoptóticos como se ejemplifica en la figura 18.

Durante el paso del tiempo es probable observar en las células control (sin tratamiento), morfología de muerte por apoptosis debido a que al estar en un medio *in vitro*, los nutrientes del medio se terminan y el espacio físico para el crecimiento de las células esta limitado para poder seguir desarrollándose, lo anterior origina que se desencadene el mecanismo de muerte por apoptosis y eventualmente el cultivo celular muere, esto ocurre en un periodo de tiempo aproximado de 48h.

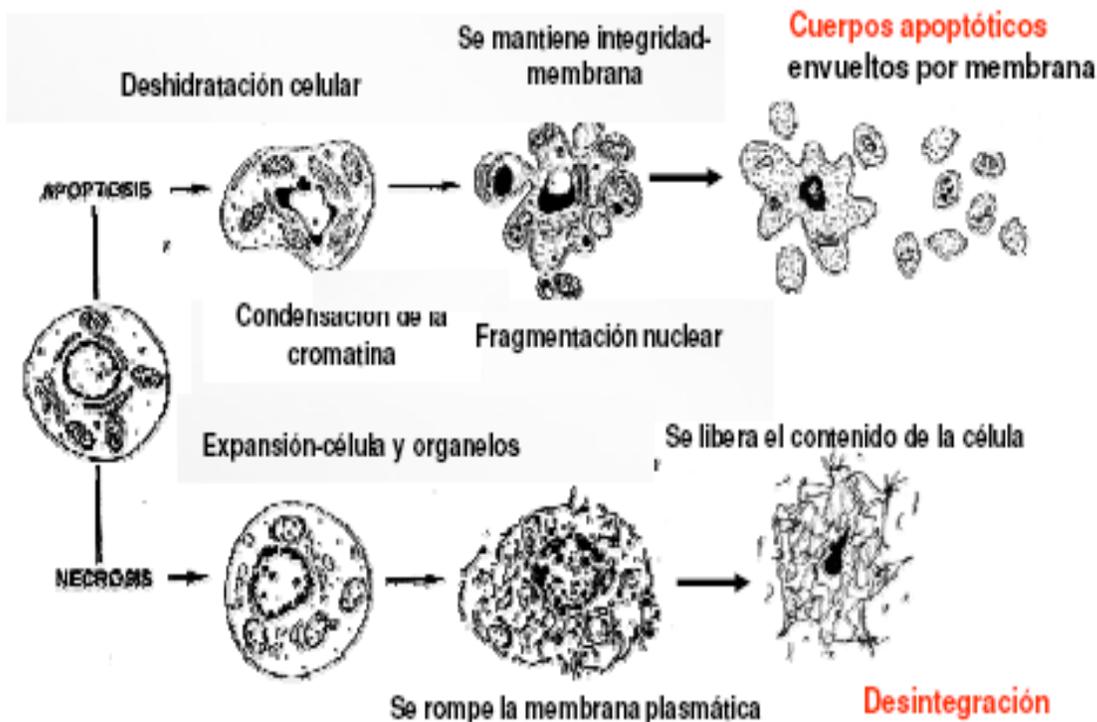


Figura 18. Apoptosis, esquema comparativo con la Necrosis.

Al centro: célula normal. Abajo, signos de necrosis; Arriba: cambios nucleares de la apoptosis con cuerpos apoptóticos. Nótese la conservación de organelos en apoptosis.

14.4. Efecto en la morfología en células HeLa tratadas con el compuesto III.

Para tratar de elucidar el tipo de muerte que inducen estos nuevos compuestos sobre las líneas celulares evaluadas se llevó a cabo un análisis morfológico al microscopio de luz de la línea celular HeLa tratada con el compuesto III a 10 μM que resultó ser el más activo, para así poder observar su efecto en la morfología celular. La tinción se hizo con eosina/hematoxilina que como complemento a la técnica de TUNEL, mostró una marcada alteración en la morfología de su membrana nuclear y citoplasmática en las primeras 20 horas; después se fue perdiendo la adhesión celular, se observó condensación de la membrana, formación de posibles cuerpos apoptóticos, es decir que se observa desintegración de las células, lo que hace inferir que estos compuestos inducen una muerte tipo apoptótica.

Al microscopio de luz, estas posibles células apoptóticas se observaron como células pequeñas, hiper eosinófilas, de citoplasma redondeado u oval con o sin material nuclear basófilo. El citoplasma en fases más avanzadas aparece fragmentado, que varían de tamaño considerablemente. La cromatina aparece como masa densa hiperbasófila.

En el citoplasma hay agregación de filamentos intermedios apenas perceptibles, formación de grumos de lo que seguramente podrían ser proteínas ribosomales, agrupación concéntrica de retículo endoplásmico rugoso, las células con abundante citoplasma forman prolongaciones muy prominentes. Finalmente se observa que estos organelos se separan para formar los fragmentos denominados cuerpos apoptóticos.

Los resultados observados en comparación con Taxol del cual se sabe induce muerte celular por apoptosis son similares. Ver figura 19.

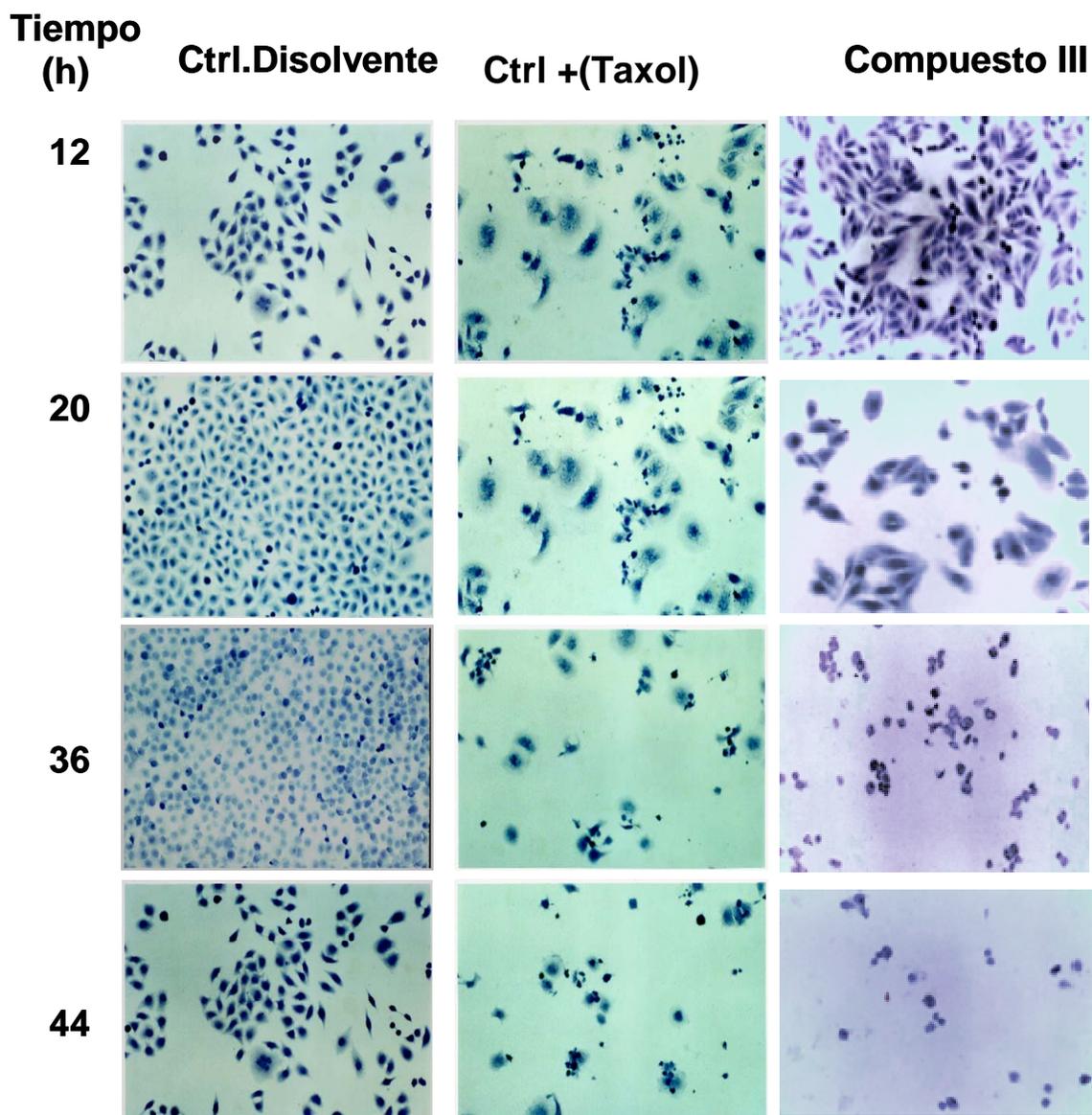


Figura 19. Tinción con Hematoxilina/Eosina. Tinción en la línea celular HeLa tratada con el compuesto III a una concentración de 10 μM . Se muestra el comparativo con el control de solvente DMSO y el control positivo con Taxol a 0.25 μM . Aumento 40X.

15.0 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se evaluó la actividad biológica (inhibición de la proliferación celular) de 4 nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas mediante pruebas biológicas *in vitro*, utilizando líneas celulares tumorales humanas. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

Se determinó la IC₅₀ de los cuatro derivados; con base en los valores obtenidos y las diferencias estructurales de los compuestos, se observa que los compuestos con mayor actividad son el II, III y IV, cuya característica común es la cadena dietilpropilendiamina (grupo alquilamino) y un sustituyente anilino en el anillo B, cuyo valor de IC₅₀ fue más pequeño en comparación con el compuesto I que no presenta ésta cadena como sustituyente en el anillo de tiazolo (tabla 3), como sustituyente en el anillo de tiazolo y, con base a los resultados obtenidos no presentó actividad citotóxica relevante a las diferentes concentraciones utilizadas en las líneas celulares tumorales.

La presencia de la cadena dietilpropilendiamina como sustituyente en el anillo de tiazolo, sugiere importancia relevante para presentar actividad citotóxica en las líneas celulares como también el trabajo de Álvarez Ibarra y colaboradores muestra que de la síntesis que realizaron de los primeros derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas con presencia de un sustituyente alquilamino (dietiletilendiamino), mostraron mayor actividad citotóxica de dichos compuestos respecto a los que no lo contenían⁽⁴⁾. Posteriormente Lira Rocha y col. Al sintetizar las dos primeras generaciones de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas con base a estudios moleculares señalaron lo mismo y lo comprobaron realizando estudios de actividad citotóxica.⁽⁶⁹⁾

En el presente trabajo, la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de los cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas, reafirma la importancia de la cadena alquilamino sobre la inhibición de la proliferación celular de las líneas tumorales humanas. Los compuestos que contienen esta cadena alquilamino presentaron mayor actividad citotóxica con valores de 7.46 – 29.15 µM (tabla 3).

Adicionalmente, otra características estructural de los nuevos derivados es la presencia de grupos funcionales en el grupo anilina del anillo B de

tiazoloquinolina: Nitrógeno en posición *meta* para el compuesto II, Cloro en posición *meta* para el compuesto III y Nitrógeno en posición *para* en el compuesto IV; de los cuales el compuesto III presentó valores de IC₅₀ menores en comparación con los derivados II y IV. El grupo -Cl en el anillo de anilina parece contribuir a la actividad citotóxica del compuesto (tabla 3).

Para el compuesto I que no contiene la cadena alquilamino y a pesar de tener el grupo anilino con un sustituyente carboxílico (-COCH₃), no presentó actividad citotóxica considerable. Lo anterior sugiere que la combinación de los sustituyentes alquilamino y anilina con la presencia del grupo Cloro, sugieren ser importantes para favorecer la actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales humanas y también en cuanto su potencia si comparamos el compuesto III respecto al II y IV (tabla 3). Es decir que los grupos electroattractores en el grupo anilina favorecen la actividad citotóxica, lo cual es soportado por los trabajos de Lira Rocha y col. ⁽⁴⁰⁾

En general se observó que los nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina con la presencia del grupo alquilamino (dietilpropilendiamina) presentaron más actividad citotóxica que aquellos que no la contienen como el compuesto I y, que dicha actividad se ve favorecida en aquellos compuestos adicional al sustituyente alquilamino presentan el grupo cloro en el sustituyente anilina, como lo es el compuesto III.

El carácter lipofílico de los compuestos, hace que sean menos susceptibles a la resistencia a fármacos como por ejemplo mediada por las P-glicoproteínas (proteínas de membrana que actúan como mediadoras de extracción de sustancias tóxicas para la célula, disminuyendo la concentración de los fármacos en el interior de la célula tumoral), ya que dicha característica hace que rápidamente difundan a través de la membrana celular, alcanzando altas concentraciones intracelulares sin tener efecto significativo en la mediación de resistencia a fármaco, los niveles de expresión de P-glicoproteína ⁽⁷⁵⁾. En el caso del compuesto I, pudiera pensarse que algún mecanismo de resistencia de este tipo podría estar relacionado, ya que es una molécula con una cadena alquilamino corta en comparación a los otros tres derivados.

Así mismo se observó que de las líneas celulares tumorales humanas utilizadas, la más sensible a los nuevos derivados de tiazoloquinolina fue K-562 con los valores en general más bajos de IC_{50} . El compuesto III que resultó ser el más activo con valores de IC_{50} más bajos, tuvo la mayor potencia sobre la línea celular HeLa con un valor promedio de 7.46 μ M. La importancia de que un compuesto presente mayor actividad citotóxica sobre un(os) tipo(s) de línea celular tumoral humana podría representar utilidad en la terapia clínica antitumoral de algún tipo de cáncer específico.

El mecanismo de acción mediante el cual éste tipo de compuestos induce la inhibición de la proliferación celular y que estructuralmente son parecidos a la amsacrina, se ha descrito por las características estéricas y electrónicas de la molécula, donde dicha actividad se puede atribuir a un mecanismo de intercalación del compuesto en el ADN de la célula inhibiendo la enzima topoisomerasa II por formación de un complejo terciario Fármaco-DNA-Enzima, lo que imposibilita a la célula su replicación, llevándola a muerte celular por apoptosis.

La bibliografía reporta que compuestos heterocíclicos con estructura planar y largos en cuanto a cadenas alquilantes, como es el caso de los nuevos derivados evaluados en el presente trabajo, favorece la intercalación al ADN (cuya intercalación en algunos casos puede ser reversible) y presentar actividad citotóxica. Algunos autores ⁽³¹⁾, refieren que en estudios *in-vitro* de relación estructura – actividad, el tipo de enlace entre la topoisomerasa II y el ADN parece ser importante para la actividad citotóxica de los fármacos, aunque en algunos casos, ésta interacción fármaco-ADN no es condición suficiente para mostrar actividad antitumoral, parece que para el caso de los nuevos derivados de tiazoloquinolina no es el caso. Los resultados muestran una correlación entre la estructura – actividad sobre el efecto citotóxico en las líneas celulares humanas, confirmándose que cambios en el núcleo de tiazolo[5,4-b]quinolina confieren mayor o menor actividad citotóxica como lo muestra la determinación de la CI_{50} .

Como objetivo del presente trabajo también se planteó conocer la posible inducción de las características de muerte celular programada (muerte por

apoptosis), por lo que se seleccionó el compuesto III que presentó la mayor actividad citotóxica de los cuatro nuevos derivados y se comparó con el fármaco antineoplásico Taxol, usado en la terapia oncológica como control positivo de inducción de apoptosis.

Se realizaron dos técnicas para el análisis de la inducción de muerte por apoptosis: la observación al microscopio de los cambios morfológicos de las células después de ser expuestas a los cuatro nuevos derivados (tinción con hematoxilina-eosina), donde se observó daño celular similar al inducido por el taxol (figura 19), el tipo de muerte celular por apoptosis que lleva a la fragmentación del ADN se corroboró también mediante la técnica de TUNEL donde fue posible apreciar la formación de los cuerpos apoptóticos característicos de éste mecanismo de muerte. Respecto al Taxol, los efectos del compuesto III fueron similares y se observan ligeramente menos rápido que dicho fármaco.

Con los resultados obtenidos se puede sugerir que estos nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas inducen muerte celular por apoptosis.

El uso potencial de algún tipo de compuestos como agentes terapéuticos, hace necesario conocer los requerimientos moleculares que intervienen o determinan su actividad biológica, de ahí la pertinencia de los estudios de estructura- actividad.

En el caso particular de estos derivados, los resultados servirán para deducir la relación entre la estructura y la actividad citotóxica que permitan nuevas estrategias de síntesis de modificación estructural. Como por ejemplo, el reconocimiento de los estudios hechos por Spicer y colaboradores donde refiere que sustituyentes pequeños en la posición 5 de derivados de núcleo de carboxiamido acridinas, incrementaba la potencia citotóxica de los compuestos evaluados ^(75,86).

Debido a que el efecto citotóxico de los compuestos tipo acridina depende tanto del hecho de su intercalación en el ADN como de su interacción molecular directa con las enzimas topoisomerasas I y II (en la formación del complejo enzima-fármaco-ADN) es importante hacer notar que la estructura de los derivados es importante a nivel de interacción estereoquímica.

Estudios de relación estructura – actividad de Zurisaddai y colaboradores reportan que la potencia citotóxica es mayor en aquellos compuestos con sustituyentes que no favorecen la deslocalización de la carga positiva del núcleo de acridina (el cual determinaron esta protonado a pH fisiológico), incrementando así la densidad de carga positiva del mismo. La presencia de este tipo de sustituyentes bien podría aumentar la fuerza del complejo de transferencia de carga que se forma entre los pares de bases y la molécula de acridina intercalada, reforzándose con ello la interacción con el ADN ^(75,86). También dicho grupo de investigadores reportan que la hidrofobicidad de los sustituyentes de acridina, parece no ser determinante para la actividad citotóxica de los compuestos estudiados, pero sí para su difusión a través de la membrana celular. Lo anterior esta de acuerdo con la mayoría de los estudios de relación estructura actividad (QSAR) que se han realizado sobre acridinas; además de que indican que la actividad citotóxica de algunos análogos de acridina ya estudiados, está relacionada con el tamaño y la capacidad deslocalizante de carga positiva de los sustituyentes.

Como se mencionó previamente y con base en los resultados observados, es posible que el principal mecanismo de acción de los nuevos derivados de tiazoloquinolina para llevar a muerte celular por apoptosis las células tumorales, sea el de la inhibición de la topoisomerasa II, no se debe descartar la probabilidad de que exista(n) otro(s) mecanismo(s) de citotoxicidad presentes, como por ejemplo el estrés oxidativo mediado por especies reactivas de oxígeno (EROS) que se pueden generar durante alteración del equilibrio de transporte de electrones en la mitocondria mediado por la enzima NADPH oxidasa donde cataliza la reacción de transformación del oxígeno presente en el citosol al anión superóxido O_2^- y anión Hidroxilo OH^- que puede dañar el DNA ⁽²⁸⁾.

Estos nuevos derivados sin duda son prometedores en primera instancia por su origen razonado y su posible aplicación en modelos de regresión tumoral *in vivo* lo que podría contribuir en la búsqueda de nuevos fármacos como nuevos agentes antitumorales con menores efectos adversos como los usados actualmente en la terapia oncológica.

16.0 CONCLUSIONES

Se determinó la actividad biológica de cuatro nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina en líneas celulares tumorales humanas, encontrándose que inhiben la proliferación celular.

La potencia citotóxica fue mayor en aquellos compuestos con sustituyentes Cl y –CN en el anillo de anilina, y que a su vez tienen una cadena alquilamino en el carbono C-2 del núcleo de tiazoloquinolina, por lo que estas características estructurales favorecen la actividad citotóxica.

El compuesto III (Cl en C-3 del grupo anilina) fue el más activo para todas las líneas celulares tumorales humanas y la línea celular K-562 de leucemia fue la más sensible a los cuatro compuestos.

El estudio de los cambios morfológicos observados al microscopio mostraron cambios característicos de una muerte inducida por apoptosis como son alteración en la membrana nuclear y citoplasmática, condensación de la cromatina, formación de grumos en citoplasma y compartimentalización de la célula (formación de posibles cuerpos apoptóticos).

Los resultados del ensayo de TUNEL, sugieren que el compuesto III induce una muerte celular por apoptosis en las primeras 20 h en las líneas celulares K-562 y HeLa, de lo cual también se deduce que estos derivados interactúan con el ADN, fragmentándolo muy probablemente por la estabilización de la ADN topoisomerasa II.

17.0 BIBLIOGRAFIA

1. **A. Ng.**, G.M. Taylor, O.B.Eden. Treatment-related Leukaemia—a Clinical and Scientific Challenge. *Cancer Treatment Reviews*. 26; 377-391; (2000).
2. **ANNA R.** Martirosyan., Rayhana Rahim-Bata., Andrew B. Freeman., Charles D. Clarke., Rachael L. Howard., Jeannine S. Strobl. Differentiation-inducing Quinolines as Experimental Breast Cancer Agents in the MCF-7 Human Breast Cancer Cell Model. *Biochemical Pharmacology*. 68 (2004) 1729-1738.
3. **ALFARO M.** Ernesto, García C. Claudia, Dueñas G. Alfonso. Métodos de Detección de la Apoptosis, Aplicaciones y Limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*; 46; 4; (2000) 275-280.
4. **ALVAREZ** Ibarra Carlos, Fernández Granada Rocío, Quiroga L. María, Carbonell Angélica, Cárdenas Francisco, Giralt Ernest. Synthesis and Antitumor Evaluation of New Thiazolo[5,4-b]quinoline Derivates. *J. Med.Chem.* (1997), 40, 668-676.
5. **ATCC**, Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7a ed. Rockville, Maryland,(1992), 4,122,123,129,130,219,220,223p.
6. **ATWELL G.J.**; Cain B.F. Seelye R.N.; *J. Med. Chem.*; 15;611 (1972)
7. **BEATA M.** Gruber, Elzbieta L. Anuszczywska, Janusz S. Skierski. Activation of Program Cell Death (apoptosis) by Adriamycin in Human Neoplastic Cells.
8. **BRIAN** y col.,*Cancer* suppl, 72:3484-3488 (1993)
9. **CAIN B.F.**, Atwell GJ, Seelye RN. Potential antitumour agents. 11. 9-anilinoacridines. *J Med Chem.* (1971) Apr; 14(4):311-5.
10. **CARLSON CB**, Beal PA. Solid-Phase Synthesis of Acridine-Based Threading Intercalator Peptides. *Bioorg.Med. Chem. Lett*, 10: 1979-1982 (2000)
11. **CARMICHAEL J.**, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res.* 15; 47(4): (1987) 936-42.
12. **CARMICHAEL J**, Mitchell JB, DeGraff WG, Gamson J, Gazdar AF, Johnson BE, Glatstein E, Minna JD. Chemosensitivity Testing of Human Lung Cancer Cell lines using the MTT Assay.*Br J Cancer.* Jun; 57-6-(1988):540-7.
13. **CHOW KC**, Ross WE. Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression. *Mol Cell Biol.*; 7(9): (1987) Sep 3119-23.
14. **COULTAS L**, Strasser A. The molecular control of DNA damage-induced cell death. *Apoptosis* (2000);5:491-507
15. **DARLING**, D,C and Morgan S.J. *Animal Cells Culture and Media*. Essential data. Wiley, page. 10, 151. (1994)
16. **DB LONGLEY**, PG Johnston. Molecular Mechanisms of Drug Resistance. *Journal of Pathology*. 205; 275-295. (2005)
17. **DONALD** Voet and Judith Voet. *Bioquímica*. Capítulo 33

18. **EASTMAN** A, Rigas JR. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol* (1999); 26:7-16.
19. **EWING**, J: *Neoplastic Diseases: A Textbook on Tumors*. Philadelphia, W. B. Saunders, and London, 1919. Fourth edition 1940.
20. **FOYE**, William O. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. ACS. Professional Reference Book. Washington D.C. (1995).
 - a) Chapter 2: Prediction of Biochemical Mechanism of Action from the In Vitro Antitumor Screen of the National Cancer Institute. KENNEHT D. Paul y col.
 - b) Chapter 4: Agents that Reaction with DNA. J.A.Montgomery.
 - c) Chapter 5: Topoisomerase II Inhibitors. Inhibitors of DNA Topoisomerases. SISIR K.Sengupta.205-259
21. **GAVRIELI** Yael, Yoav Sherman, Shmuel A. Ben-Sasson. Identification of Programmed Cell Death in Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology.*; 119;3 (1992) 493-501.
22. **GOODMAN & GILMAN**; *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Addison Wesley; 11 ed. Vol. 2. (1999).
23. **GOTTLIEB** TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* (1996); 1287:77-102.
24. **GRAZIA**, F. María. Chiarello G., Gasparotto Venussia., Dalla V. L., Pezzi V., Barzón L., Palu G., Castagliuolo I. Synthesis and in Vitro and in Vivo Antitumor Activity of "-Phenylpyrroloquinolin-4-ones. *J.Med.Chem.* (2005), 48, 3417-3427.
25. **HARRIS** A.L, Hochhauser D. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Treatment. *Acta Oncol.* (1992);31(2):205-13
26. **HE** Qin., Huang Ying., Sheikh M. Saeed. Bax deficiency affects caspase-2 activation during ultraviolet radiation-induced apoptosis. *Oncogene* (2004) 23, 1321-1325
27. **HERNÁNDEZ** Luis, Francisco. Toxicología. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. U.N.A.M. Programa semestre (2004)-I. Capítulo 10.- Mutagénesis Química (10.1)
28. **HIRAOKA** Wakako, Vazquez Nancy, Nieves-Neira Wilberto, Pommier Yves, Chanock Stephen. Role of Oxygen Radicals Generated by NADPH Oxidase in Apoptosis Induced in Human Leukemia Cells. *The J. Of Clinical Investigation.* 102, 11. (1998); 1961-1968
29. **HITOSHI** Okada, Tak W. Mak. Pathways of Apoptotic and Non-Apoptotic Death in Tumour Cells. *Rev. Nature.* Vol 4. 592-603. August (2004).
30. **H-J Tang.**, D. Qian., VK, Sondak, S Stachura, J. Lin., A Modified p53 Enhances Apoptosis in Sarcoma Cell Lines Mediated by Doxorubicin. *British Journal of Cancer* 82004) 90, 1285-1292.
31. **HYZY** Magdalena. Przemyslaw Bozko., Konopa Jerzy., Skladanowski Andrzej. Antitumor imidazoacridone C-1311 induces cell death by mitotic catastrophe in human colon carcinoma cells.. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 801-809.
32. **JEFF** Cummings, Tim H. Ward, Malcom Ranson, Caroline Dive. Apoptosis Pathway-targeted Drugs—From the Bench to the Clinic. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1705; 53-66. 2004

33. **KAUFFMAN** FC, Desnoyer S, Ttaviano Y, Davison NE, Poirier GG. Specific cleavage of PARP: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* (1993); 53:3976-3985.
34. **KERR** JF; A.Wyllie, and A.R. Currie. Apoptosis: Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. Journal Cancer.* 26: 239-257. (1972)
35. **KERR** JF. Winterford CM. Harmon BV. Apoptosis. Its Significance in Cancer and Cancer Therapy. *Cancer.* 15;73(8): Apr (1994) 2013-26
36. **L. Dassonneville**, K. Bonjean, M.C. De Pauw-Gillet, P. Colson, C. Houssier, J. Quetin-Leclercq, L. Angenot, C. Bailly, Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by three DNA-intercalating Plant Alkaloids. Cryptolepine, Matadine and Serpentine, *Biochemistry* 38 (1999) 7719–7726.
37. **LA-FOND**, R.; *Cancer; The outlaw cell; American Chemical Society, Washington, D.C.; (1988).*
38. **LAURENT**. Dassonneville, N. Wattez, B. Baldeyrou, C. Mahieu, A. Lansiaux, B. Banaigs, I. Bonnard, C.Bailly, Inhibition of topoisomerase II by the marine alkaloid ascididemin and induction of apoptosis in leukemia cells, *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 527–537.
39. **LEE** Eric A., Michael K. Keutmann, Melissa L. Dowling, Eleanor Harris, Gordon Chan, Gary D. Kao. Inactivation of the Mitotic Checkpoint as a Determinant of the Efficacy of Microtubule-targeted Drugs in Killing Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics.* ;3;6;(2004) 661-9
40. **LOZA**, Mejía Marco A. Trabajo de Tesis de Maestría " Síntesis y análisis de Relación Estructura-Actividad Citotóxica de Derivados de Tiazolo[5,4-b]quinolina". 2004.
41. **LOZZIO**, C.B. and Lozzio, B.B. *Blood.*45, 321. (1975).
42. **LUNDBERG** AS, Weinberg RA. Control of the Cell Cycle and Apoptosis. *Eur J Cancer* (1999); 35:531-539.
43. **L.S.Lerman**, Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. *J. Mol. Biol.* 3(1961) 18–30.
44. **LYNCH**, J.M. y col. *Métodos de Laboratorio. Interamericana* pág. 1099-1104,1153. Méx. D,F. (1991).
45. **MARSHALL** B., Rhalph R.K. The Mechanism of Action of mAMSA. *Advances in Cancer Research.* 14. (1985) 267-281.
46. **MARTIN**, Schuler. Ella Bossy-Wetzel, Joshua C. Goldstein, Patrick Fitzgerald, Douglas R. Green. p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *Journal of Biological Chemistry.* 275, 10. (1999) 7337-7342.
47. **MASAYUKI** Okada, Souichi Adachi, Tsuyoshi Imai, Ken-ichiro Watanabe, Shin-ya Toyokuni, Masaki Ueno, Antonis s. Zervos, Guido Kroemer, and Tsatsutoshi Nakahata. A Novel Mechanism for Imatinib Mesylate-Induced Cell Death of BCR.ABL-positive Human Leukemic Cells: Caspase-independent, Necrosis-Like Programmed Cell Death Mediated by Serine Protease Activity. *Blood.* 103, 6 (2004) 2299-2307.5
48. **MASTERS** JR. Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol.*;19(4): (1990) Dec : 297-305

49. **MOSMANN**, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J. Immunol Methods* 65: (1983) 55-63.
50. **MOTTIER, Lourdes**. Lanusse, Carlos. Bases Moleculares de la Resistencia a Fármacos Antihelmínticos. Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2001
51. **M.J. WARING**, Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs. Evidence for Molecular Models Involving Intercalation, *J. Mol. Biol.* 54 (1970) 247-279.
52. **NASSER** A. Daghasanli., Marcelo M. Rossa., Heloisa S.S., Antonio C. Tedsco., Iouri E. Borissevitch., Igor A. D. Citotoxicity of Nitroheterocyclic Compounds, Quinifuryl and Nitracrine, Towards Leukaemic and Normal Cells on the Dark and under Illumination with Visible Light. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 75 (2004) 27-32.
53. **NEOPLASIA**. Manual de Patología General. Univ Cat. De Chile. http://escuela.med.puc.cl/publ/PatologiaGeneral/Patol_099.html (2005)
Cap. 5. Alteraciones del Crecimiento y del Desarrollo. Tumores de Tejidos Linforreticulares y Hematopoyéticos.
54. **NEGRI C.**, Bernardi R, Donzelli M, Scovassi Al. Induction of apoptotic cell death by DNA topoisomerase II inhibitors. *Biochimie*; 77(11): (1995): 893-9.
55. **NELSON**, E.M.; Tewey, K.M.; Leu L.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*;81;1361; (1984)
56. **NIV** Papo, Amir Braunstein, Zelig Eshlar, Yechield Shai. Suppression of Human Prostate Tumor Growth in Mice by a Cytolytic D-, L-Amino Acid Peptide: Membrane Lysis, Increased Necrosis, and Inhibition of Prostate-Specific Antigen Secretion.
57. **OLVERA**, Vázquez Susana; Síntesis de 2(-N',N'-alquil-N-trimetilamina)-9-anilino-tiazolo[5,4-b]quinolinas como potenciales antitumorales. Tesis para el obtener el título de químico farmacéutico biólogo. UNAM, México D.F, 2005.
58. **PARKER** W. Bernard., Kaur Gurmeet., Nieves-Neira Wilberto., Taimi Mohammed., Kohlhagen Glenda., Shimizu T., Losiewicz Michael D., Pommier Yves., Sausville Edward., Senderowicz Adrian. Early induction of Apoptosis in Hematopoietic Cell Lines after Exposure to Flavopiridol. *By The American Society of Hematology in Blood* 91. 2. (1998). 458-465.
59. **PEREZ** RP, Hamilton TC, Ozols RF, Young RC. Mechanisms and Modulation of Resistance to Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Cancer.* 15;71(4 Suppl) Feb (1993):1571-80.
60. **PHILIPS**, H.J. and Terryberry, J.E., Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp. Cell. Res.*,13, 341-347. (1957)
61. **POMMIER**, Y.; Zwelling, L.A.; Kao-Shaw; *Cancer Research*;45;3143;(1985)
62. **PRUSCHY** M, Rocha S, Zaugg K, Tenzer A, Hess C, Fischer DE, et al. Key target for the execution of radiation-induced tumor cell apoptosis: the role of p-53 and caspases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* (2001);49:561-7
63. **QUINTERO** Angelina, Araceli Pelcastre, José D. Solano. Antitumoral Activity of Pyrimidine Derivates of New Sesquiterpene Lactones. *J. Paharm Pharmaceut Sci.* ;2, 3; 108-112, (1999)

64. **REMINGTON** Alfonso Gennaro. Farmacia. Tomo II. 19 ed. Panamericana. Philadelphia College of Pharmacy and Science. Mexico, (1999).
Capítulo 75. Drogas Antineoplásicas e Inmunoactivas. Por Louis R. Barrows
65. **ROBINSON** Megan J., Barbara Anne M., Thomas d. Gootz, Paul R. M., Neil Osheroff. Effects of Novel Fluoroquinolones on the catalytic Activities of Eucaryotic Topoisomerase II: Influence of the C-8 Fluorine Group. Antimicrobial Agents and Chemoterapy 36,4(Apr.1992) 751-756
66. **ROCA**, Joaquin., Topoisomerasas de ADN de tipo II. Mediante cortes momentáneos en las cadenas de ADN las topoisomerasas de tipo II modulan la torsión de la molécula y eliminan los anudamientos que se generan en la doble hélice durante los provcesos de actividad genética. Investigación y Ciencia, octubre, (2002). 2-11.
67. **ROCHE**. Instruction Manual KIT 1 684 817. In Situ Cell Death Detection, POD.; 4;February (1999).3-13.
68. **RODRÍGUEZ** L. Ma. Pilar. Síntesis de derivados de Tiazolo[5,4-b]quinolina como potenciales intercaladores del ADN; Tesis de M en C. Q.; Q.F.B; Facultad de Química; U.N.A.M. (2000).
69. **RODRÍGUEZ** L. Pilar., Angelina Quintero., Rogelio Rodríguez Sotres., José D. Solano., Alfonso Lira Rocha A.Synthesis and Evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as Potential Antitumorals. European Journal of Medicinal Chemistry. 39 (2004) 5-10.
70. **SÁNCHEZ** A. Jesús A., Pilar López Aparicio, María N. Recio, Miguel A. Pérez-Albarzans. Polychlorinated Biphenyl Mixtures (Aroclors) Induce Apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 Proteins in Neural Cell Cultures. Toxicology Letters; 153; (2004);311-326.
71. **SHERR** J. Charles. Cancer Cell Cycles. Science, Vol 274, Issue 5293, 1672-1677 ,Dec. (1996)
72. **SOULE**, H.D. y col. J. Nath.Cancer Institute. S.I, 1409. (1973)
73. **SPICER**, J.A.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Velea, L.; Graves, D. E.; Denny W.A. Anti-Cancer Drug Des. 1999, 14, 37-45.
74. **STACIE** J, Froelich-Ammon, Neil Osheroff. Topoisomerase Poison: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism. American Cancer Society. MiniRev. (1995)
75. **SU** T.L, Chou TC, Kim JY, Huang JT, Ciszewska G, Ren WY, Otter GM, Sirotnak FM, Watanabe KA. 9-substituted Acridine Derivatives with Long Half-Life and Potent Antitumor Activity: Synthesis and Structure-Activity Relationships. J Med Chem. (1995) Aug 18;38(17):3226-35.
76. **T.ASANO**. K. Nakamura, H. Fujii, N. Horichi, T. Ohmori, K. Hasegawa, T. Isoe, M. Adachi. N. Otake and Y. Fukunaga. Altered expression of topoisimerase II α conmtributes to cross-resistant to etoposide K562/MX2 cell line by aberrant methylation. British Journal of Cancer. 2005, 92.
77. **TAYLOR** WR, Stark GR. Regulation of the G2/M Transition by p53. Oncogene (2001);20:1803-15
78. **VLADIMIR** Wsól, Barbora Szotáková, Lenka Skálová, Edmund Maser. The Novel Anticancer Drug Oracin: Different Stereospecificity and Cooperativity

- for Carbonyl Reduction by Purified Human Liver 11 β -hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1. *Toxicology* 197; 253-261; (2004)
79. **W.A. Denny**, DNA-intercalating Ligands as Anti-cancer Drugs: Prospects for Future Design. *Anti-Cancer Drug Des.* 4 (1990) 241–263
 80. **WANG**, J.C.J. *Biol. Chem.* (1969), 43, 263.
 81. **WATSON**, James D. y col. *Molecular Biology of the Gene*. Chapter 27. The Origins of Human Cancer. Fourth edition. Benjamin-Cummings Publishing. U.S.A. (1998). 1058-1060.
 82. **WILFRIED** Bursch, Karin Hochegger, Ladislaus Tôrök, Brigitte Marian, Adolf Ellinger, Rolf S. Hermann. Autophagic and Apoptotic Types of Programmed Cell Death Exhibit Different Fates of Cytoskeletal Filaments. *Journal of Cell Science.* 113, 1189-1198, (2000)
 83. **XIA**, Y , Yang ZY, Xia P, Bastow KF, Tachibana Y, Kuo SC, Hamel E, Hackl I, Lee KH. Antitumor Agents. 181. Synthesis and Biological Evaluation of 6,7,2',3',4'-substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a New Class of Antimitotic Antitumor Agents. *J Med Chem.*; 41(7):1155-62. (1998) Mar 26
 84. **YEUNG-LEUNG** Cheng., Wen Liang Chang., Shih-Chun Lee, Yau-Gye Liu, Cheng-Jueng Chen, Shinn-Zong Lin, Un-Man Tsai, Dah-Shyong Yu, Chung-Yang Yen, Horng-Jyh Harn. Acetone Extract of *Angelica sinensis* Inhibits Proliferation of Human Cancer Cells via Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Life Sciences* 75 (2004) 1579-1594.
 85. **YUN-HEE**, Kim., Shin Kum-Joo, Lee, G. Taehoon, Kim-Euikyung., Lee Myoung-Shik., Sung Ho-Ryu., Pann-Ghill Suh.; G2 Arrest and Apoptosis by 2-amino-*N*-quinoline-8-yl-benzenesulfonamide (QBS), a Novel Cytotoxic Compound. *Biochemical Pharm.* (2005) 1333-1341.
 86. **ZURISADDAI**, Hernández Gallegos.; Pérez Álvarez Victor. Un estudio cuantitativo de la relación estructura – actividad de una serie de N-[2-(dimetilamino)etil]acridina-4-carboxamidas con actividad citotóxica. *Journal of the Mexican Chemical Society*, julio-septiembre. Año/vol 46, número 003. Sociedad Química de México. Pp 223-226. 2002.
 87. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>. Estadísticas Vitales. Edición 2008. INEGI. Actualización: 03 febrero 2011.
 88. (100)<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm> Actualización (2005).
 89. <http://dev2.prous.com/oncologiaformacion/loginframe.htm.asp>
 90. <http://mmb.pcb.ub.es/em/PDF/TEMA16.pdf#search='intercalacion%20de%20dna'>
 91. <http://www.efn.uncor.edu/dep/biologia/intrbiol/ciclo.htm>
 92. http://www.qo.fcen.uba.ar/Cursos/quimed_files/ADN05.pdf