



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL USO COMBINADO DEL DERIVADO
TIAZOLO[5,4-b]QUINOLINA "D3CLP" CON ANTINEOPLÁSICOS DE USO
CLÍNICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTOR
DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. Agosto, 2013



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.

Evaluación *in vitro* del uso combinado del derivado tiazolo[5,4-*b*]quinolina “D3CLP” con antineoplásicos de uso clínico

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes en el laboratorio de Biología de la Reproducción y Muerte Celular, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Leticia Rocha Zavaleta Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Marcela Lizano Soberón Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Marco A. Cerbón Cervantes Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la asesoría del Dr. Andrés Navarrete, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM, en los experimentos de combinación de fármacos.

Se reconoce la colaboración del Dr. Alfonso Lira Rocha, del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM, quien proporcionó el compuesto D3CLP empleado en esta tesis.

El proyecto fue apoyado por ICyTDF (234/2010). Durante los estudios de Doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (No. de becario: 226748/CVU: 298713) para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Alejandro García Carrancá	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Elizabeth Langley McCarron	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
IV. ABREVIATURAS	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Cáncer	5
1.2 Terapia del cáncer	6
1.2.1. Cirugía	6
1.2.2. Radioterapia	7
1.2.3. Quimioterapia	7
1.2.3.1 Algunos fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer	9
2. ANTECEDENTES	15
2.1 Tiazolo[5,4- <i>b</i>]quinolinas	15
2.2 Combinaciones de fármacos	17
2.2.1 Ventajas de la terapia combinada en el tratamiento del cáncer	17
2.2.2 Métodos para evaluar el efecto combinado de fármacos	18
2.2.3 Algunas combinaciones de fármacos estudiadas <i>in vitro</i>	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVO GENERAL	23
5.1 Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1 Evaluación de la citotoxicidad de fármacos solos en líneas celulares	35
7.2 Estudio de la actividad citotóxica en líneas celulares de la combinación de D3CLP con antineoplásicos de uso clínico en tres proporciones	36
7.3 Análisis del efecto combinado de fármacos mediante el CI	37

7.4 Análisis isoblográfico para la combinación de D3CLP con los fármacos de uso clínico	39
7.5 Determinación de la fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con D3CLP, cisplatino y su combinación en proporción 3:1.....	44
8. CONCLUSIONES	47
9. PERSPECTIVAS	47
10. REFERENCIAS	48
11. ANEXO	57

I. RESUMEN

A nivel mundial el cáncer es una de las primeras causa de muerte, ocasionando aproximadamente el 13% de todas las defunciones ocurridas durante el 2008. De los 7.6 millones de defunciones por cáncer en 2008, aproximadamente un 70% se produjeron en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2013). Entre los tratamientos para el cáncer se encuentra la quimioterapia, en la cual se administran fármacos con el objetivo de eliminar las células tumorales. De los compuestos citotóxicos que tienen especial interés se encuentran las tiazolo[5,4-*b*]quinolinas. Estos compuestos han presentado actividad citotóxica contra diversas líneas celulares de cánceres humanos, pueden intercalarse en el DNA e inhibir la topoisomerasa II *in vitro*. El compuesto D3CLP es uno de los que presentó mayor actividad citotóxica en células de leucemia, cáncer de mama y cérvico-uterino. La combinación de fármacos en algunos casos ha demostrado ser mejor que el tratamiento administrando fármacos por separado para varios tipos de cánceres. Por ello, en el presente proyecto se estudió *in vitro* si puede potenciarse la actividad citotóxica al combinar D3CLP con antineoplásicos de uso clínico. Para ello se evaluó el efecto citotóxico de D3CLP y de los fármacos de uso clínico imatinib, tamoxifeno y cisplatino en líneas celulares de leucemia, cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino, respectivamente. Posteriormente se evaluó el efecto de la combinación de D3CLP con cada uno de los fármacos antes mencionados en las líneas celulares indicadas. El efecto de las combinaciones fue analizado por el índice de combinación al efecto medio y por análisis isobolográfico. Los resultados indican que se pueden presentar sinergismos al combinar D3CLP con fármacos de uso clínico, principalmente cuando D3CLP se encuentra en mayor proporción. Adicionalmente, los resultados de fragmentación de DNA, analizado por TUNEL, sugieren que la muerte celular inducida por D3CLP en células de cáncer cérvico-uterino HeLa es por apoptosis. Estos resultados apoyan la evaluación en ensayos preclínicos de D3CLP solo y preferentemente en combinación, ya que potencialmente podría ser un tratamiento más eficaz para diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cérvico-uterino.



II. ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death worldwide and accounted for 7.6 million deaths (around 13% of all deaths) in 2008. About 70% of all cancer related deaths occurred in low- and middle-income countries (OMS, 2013). Cancer can be treated using chemotherapy, where cytotoxic agents are administered to destroy cancer cells. Thiazolo[5,4-*b*]quinolines are compounds of special interest in cancer treatment. These thiazolo[5,4-*b*]quinolines are cytotoxic and DNA-intercalating compounds. D3CLP is a thiazolo[5,4-*b*]quinoline that induces apoptosis of leukemia cells, while it displaying low toxicity towards non-tumoral cells. Combination chemotherapy with conventional cytotoxic agents accomplishes several important objectives not possible with single-agent therapy. The aim of this study was to determine if can enhance the cytotoxicity, when D3CLP is combined with other antineoplastic drugs. Leukemia, breast and cervical cancer cell lines were exposed to D3CLP alone or in combination with imatinib, tamoxifen or cisplatin, respectively. Cell viability after treatment was evaluated by MTT assay, and cell death by TUNEL assay. The effects of combined treatments were analyzed by combination index and isobolographic analysis. Antiproliferative activity results indicate that D3CLP in combination with antineoplastic drugs induced a synergistic effect, at 3:1 and 1:1 ratios for D3CLP plus imatinib in K-562 leukemia cells, and at a 3:1 ratio for D3CLP with cisplatin in HeLa cells, as determined by their combination index. Furthermore, isobolographic analysis demonstrated a significant synergism for a 3:1 combination ratio of D3CLP with cisplatin in HeLa cells. In addition, TUNEL assay suggests cell death by apoptosis of HeLa cells after treatment with D3CLP and its combination with cisplatin at a 3:1 ratio. The results overall indicate that D3CLP alone or in combined preparation with antineoplastic drugs is a good candidate for preclinical studies in the treatment of different cancer cell types.



III. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

A. Figuras

Figura 1.	Estructura química del imatinib	10
Figura 2.	Estructura química del tamoxifeno	11
Figura 3.	Posibles mecanismos de resistencia al tamoxifeno	12
Figura 4.	Estructura química del cisplatino	13
Figura 5.	Toxicidad asociada al tratamiento con cisplatino	13
Figura 6.	Estructura química del D3CLP	16
Figura 7.	Representación de un isoblograma para la combinación de dos fármacos	19
Figura 8.	Isoblograma para la combinación de D3CLP con imatinib en células K-562	40
Figura 9.	Isoblograma para la combinación de D3CLP con tamoxifeno en células MCF-7	41
Figura 10.	Isoblograma para la combinación de D3CLP con cisplatino en células HeLa	42
Figura 11.	Determinación de la fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con D3CLP, cisplatino y su combinación en proporción 3:1, mediante TUNEL a diferentes tiempos.	45

B. Tablas

Tabla 1.	Algunos de los principales cánceres con más incidencia en México y fármacos usados en su tratamiento	9
Tabla 2.	Combinación de D3CLP con fármacos de uso clínico en proporción 3:1	31
Tabla 3.	Combinación de D3CLP con fármacos de uso clínico en proporción 1:1	31
Tabla 4.	Combinación de D3CLP con fármacos de uso clínico en proporción 1:3	31
Tabla 5.	Citotoxicidad de los fármacos en líneas celulares.	35
Tabla 6.	Actividad citotóxica para la combinación de D3CLP con los antineoplásicos de uso clínico	37
Tabla 7.	Índice de combinación al efecto medio para las combinaciones de D3CLP más fármacos de uso clínico en líneas celulares	38



IV. ABREVIATURAS.

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de Adenosina
cbp	Cuanto baste para
CI	Índice de combinación
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenediamino tetra-acético
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos (por sus siglas en inglés)
GSH	Glutación.
Hepes	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
IC ₅₀	Concentraciones que disminuyen la viabilidad celular al 50 % (IC ₅₀), respecto al vehículo
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
m-Amsa	Amsacrina
MDR	Multi-resistencia a fármacos (por sus siglas en inglés)
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCI	Instituto Nacional del Cáncer, U.S.A (por sus siglas en inglés)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA
PFA	Paraformaldehído
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
TdT	Transferasa de desoxinucleótido terminal
TGF- α	Factor de crecimiento transformante- α
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TUNEL	Transferencia de uridina marcada a los extremos en el ADN



EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL USO COMBINADO DEL DERIVADO TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA “D3CLP” CON ANTINEOPLÁSICOS DE USO CLÍNICO.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Cáncer

El término cáncer se usa para definir a un conjunto de enfermedades caracterizadas por un desequilibrio entre la división y la muerte celular (*Hanahan y Weinberg, 2011*). Se consideran enfermedades genéticas, en las que hay alteraciones en los genes que controlan la proliferación celular o muerte celular (*Bast, 2000*). Dichas células neoplásicas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo, proceso denominado como metástasis (*NCI, 2013*).

Estadísticas del cáncer

Hoy en día el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública de gran importancia a nivel mundial y su incidencia varía dependiendo de la región en que se evalúa. A nivel mundial es una de las primeras causas de muerte, ocasionando aproximadamente el 13% de todas las defunciones ocurridas durante el 2008. Entre los principales tipos de cáncer que causan esas muertes están el de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. De los 7.6 millones de defunciones por cáncer en 2008, aproximadamente un 70% se produjeron en países de ingresos bajos y medios (*OMS, 2013*).

Esta situación puede extrapolarse a nuestro país. De acuerdo a estadísticas recientes para México tenemos que del total de personas afectadas por cáncer durante el año 2010, 57 de cada 100 menores de 20 años padecieron tumores malignos en órganos hematopoyéticos y 36.5% de los pacientes hospitalizados por leucemia tenían entre 5 y 9 años. En 2010, de cada 100 mujeres de 20 años y más con tumores malignos, 24 presentaron cáncer de mama. Mientras que 8 de cada 100 hombres de 20 años y más con cáncer en 2011, presentaron neoplasia



de próstata. Los tipos de cáncer que más muertes causaron en el 2011 en hombres de 20 y más años fueron el de próstata (17%), pulmón (13%) y estomago (9%). En cuanto a las principales causas de muerte por tumores malignos en mujeres de 20 y más años en 2011 fueron por cáncer de mama (13.8%) y cáncer cérvico-uterino (10.4%) (*INEGI, 2013*). Esos cánceres, a menudo se detectan en etapas avanzadas, lo que implica una baja tasa de supervivencia.

1.2 Terapia del cáncer

El objetivo en el tratamiento del cáncer es curar la enfermedad o prolongar considerablemente la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente (*OMS, 2013*). El tratamiento del cáncer varía según el tipo y estado del cáncer. Actualmente, existen diferentes tratamientos, los cuales dependen de la naturaleza de cáncer. Los tratamientos más frecuentemente utilizados contra el cáncer son: cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y terapia con enzimas. A continuación, se comenta brevemente cada uno de los tratamientos mencionados. Dado que en el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica de diversos fármacos, es de particular interés la quimioterapia, de la que se comentará con mayor detalle.

1.2.1. Cirugía

La cirugía es uno de los tratamientos empleados en el tratamiento del cáncer y es considerado el tratamiento que puede curar a los pacientes con mayor eficiencia, cuando se puede eliminar quirúrgicamente y no se ha diseminado. Avances en las técnicas quirúrgicas y un mejor conocimiento de los patrones de distribución de diferentes cánceres han permitido a los cirujanos la resección exitosa de los tumores, sin embargo, en algunos casos la mala resección ocasiona la diseminación de las células neoplásicas a otros órganos o tejidos, proceso conocido como metástasis. Para realizar la cirugía es necesario que el cirujano esté familiarizado con la historia natural de los tipos de cáncer. Esta terapia no



puede usarse para tratar cánceres como leucemias o mielomas (*DeVita et al., 2001*).

1.2.2. Radioterapia.

La radioterapia es otra manera de tratar el cáncer. Consiste en administrar dosis de radiación en esquemas tales que maten a las células cancerosas y preserven la función de los tejidos normales. La radiación administrada puede ser de rayos gamma o rayos X (*Bast, 2000*). El daño a las moléculas biológicas por radiación se da de modo indirecto, la energía absorbida ocasiona el desprendimiento de electrones en los niveles externos de los átomos, los cuales ionizan a otras moléculas conduciendo a una cadena de reacciones complejas que terminan hasta que la energía se haya disipado. En este proceso se generan radicales libres, los cuales son muy reactivos y pueden oxidar o reducir moléculas biológicas, además pueden romper enlaces químicos (*Alison, 2002*). Las radiaciones ionizantes son particularmente efectivas en producir daños irreparables en el ADN, siendo éste el principal modo por el cual la radioterapia ejerce su efecto nocivo. Ciertos tipos de tumores, como seminomas y linfomas, responden bien a la radioterapia, mientras que otros, como melanomas y glioblastomas, son relativamente resistentes a este tratamiento (*Alison, 2002*).

1.2.3. Quimioterapia.

Uno de los tratamientos para el cáncer en estadios avanzados es la quimioterapia. Los primeros registros de la quimioterapia datan desde principios del siglo XVI cuando se administraban, por vía sistémica, metales pesados en el tratamiento del cáncer, aunque la toxicidad era severa y sólo podían curar algunos tipos de cáncer. Desde entonces, se han buscado nuevos agentes antitumorales que logren curar, controlar u ofrecer tratamientos paliativos para el cáncer (*Baquiran, 2001*).

La quimioterapia es uno de los tratamientos de primera elección para algunos tipos de cáncer y en algunos otros se emplea en combinación con radioterapia,



cirugía o inmunoterapia. El objetivo principal de los compuestos contra el cáncer usados en la clínica es inducir muerte de las células neoplásicas, inhibiendo en algunos casos procesos relacionados al ciclo celular. Los compuestos empleados en la quimioterapia pueden inicialmente ser citostáticos, ya que pueden detener la división celular y posteriormente inducir la muerte celular (*Avendaño y Menéndez, 2008*). La mayoría de los agentes antitumorales son transportados por el torrente circulatorio y no pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica, excluyendo al cerebro de su efecto (*Baquiran, 2001*).

La quimioterapia presenta dos problemas importantes: los fármacos empleados no son específicos para las células cancerosas y además presentan toxicidad, debido a que la mayoría de los compuestos contra el cáncer se administran en concentraciones altas, para que por efecto de su distribución lleguen en concentraciones óptimas a los tumores. En este sentido se han usado pro-fármacos que son selectivamente activados en los tejidos neoplásicos, aprovechando propiedades de estas células como expresión selectiva de enzimas, hipoxia y bajo pH extracelular. Otro problema en la quimioterapia del cáncer es la resistencia a los fármacos administrados debida a proteínas trasportadoras en la membrana dependientes de ATP, conocidas como glicoproteínas P (*Juliano y Ling, 1976*). Estas glicoproteínas están codificadas por un grupo de genes denominados MDR (del inglés multidrug resistance) (*Nooter y Herweijer, 1991*). Dichas glicoproteínas se encargan de sacar diversos fármacos de la célula, entre ellos los compuestos antitumorales (*Gottesman, 1993*). Además, se ha observado que después de que se ha desarrollado un mecanismo de resistencia a un fármaco antitumoral, es posible que se presente resistencia cruzada con otros fármacos usados con el mismo propósito.

En la Tabla 1 se presentan algunos de los fármacos más usados en la quimioterapia, para algunos tipos cáncer selectos.



Tabla 1. Algunos de los principales cánceres con mayor incidencia en México y los fármacos usados en su tratamiento

Tipo de cáncer	Algunos fármacos usados en el tratamiento del cáncer
Cáncer de pulmón	Cisplatino, etopósido, doxorubicina, topotecán, vincristina, paclitaxel.
Cáncer de mama	Doxorubicina, metotrexato, 5-fluorouracilo, paclitaxel, tamoxifeno, ciclofosfamida.
Cáncer de cuello de útero	Cisplatino, 5-fluorouracilo, ifosfamida, vinorelbina, paclitaxel.
Leucemia	Imatinib, citarabina, ciclofosfamida, vincristina, etopósido, doxorubicina, amsacrina.

Por su relevancia en el presente estudio, a continuación se menciona el mecanismo de acción citotóxico, toxicidad sistémica y resistencia asociada al tratamiento con los agentes antineoplásicos imatinib, tamoxifeno y cisplatino.

1.2.3.1 Algunos fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer

Imatinib

Imatinib es un fármaco derivado de fenilaminopiridina (Figura 1), empleado en la quimioterapia del cáncer como agente antileucémico (*Eiring et al., 2011; Kosior et al., 2011*). Este fármaco inhibe tirosinas cinasas al competir por el sitio de unión al ATP (*Schindler et al., 2000*). Una de estas tirosina cinasas es la proteína BCR-ABL originada por la translocación entre los cromosomas 9 y 22 (cromosoma Filadelfia) (*Heath y Moloney, 1965; Kurzrock et al., 2003; Kosior et al., 2011*).

Entre los mecanismos de resistencia a imatinib se encuentra: la sobre-expresión del la tirosina cinasa BCR-ABL, mediada por una amplificación del gen BCR-ABL. Las mutaciones que alteren la afinidad con la que las tirosina cinasas se unen a este fármaco pueden conducir a una resistencia, así como un aumento en la expresión de la glicoproteína P170 que puede promover la salida del fármaco de

la célula y en consecuencia la disminución de su concentración intracelular, entre otros (Chu y DeVita, 2007; Bixby y Talpaz, 2009; Barouch-Bentov y Sauer, 2011)

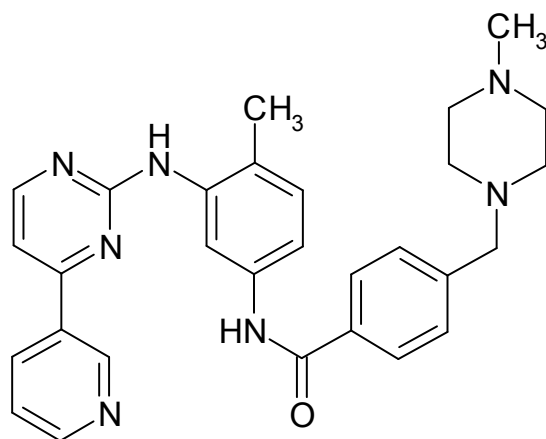


Figura 1. Estructura química del imatinib (STI571, Gleevec®).

Adicionalmente a lo antes indicado, este fármaco antileucémico tiene un costo elevado, lo que lo hace de difícil acceso a pacientes de escasos recursos económicos.

Tamoxifeno

El tamoxifeno (Figura 2) es un fármaco no esteroide que se une los receptores α y β de estrógenos, que actúa como un completo agonista parcial o antagonista a estrógenos dependiendo de la especie y el órgano blanco (MacGregor y Jordan, 1998; Palmieri et al., 2002). En la glándula mamaria humana, el tamoxifeno actúa como un antagonista competitivo, se une al receptor de estrógenos con una afinidad de aproximadamente el 2% de lo que lo hace el 17β -estradiol (Robertson et al., 1982). Estas mismas propiedades han permitido el uso del tamoxifeno desde su aprobación por la FDA en 1978 para tratar pacientes con cáncer de mama positivos al receptor a estrógenos, ya que el tamoxifeno bloquea el estímulo proliferativo de los estrógenos en células de la glándula mamaria (Ickenstein y Bandiera, 2002; Cazzaniga y Bonanni, 2012). Por esta razón, el tamoxifeno se ha considerado como una opción para todos los estadios del cáncer de mama, tanto en mujeres premenopáusicas como postmenopáusicas.

Adicionalmente, se ha propuesto el tamoxifeno para usarse en el tratamiento profiláctico de mujeres sanas que presentan alto riesgo de cáncer de mama (Smith et al., 2000).

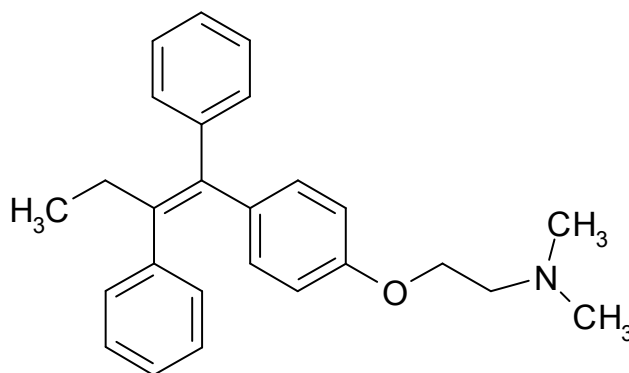


Figura 2. Estructura química del tamoxifeno (Nolvadex®)

Entre los mecanismos de resistencia al tamoxifeno se encuentran la disminución en la expresión del receptor a estrógenos o mutaciones que conduzcan a una disminución en la afinidad de este receptor por el tamoxifeno. La sobreexpresión de factores de crecimiento como el TGF- α o IGF-1 también puede conducir a una resistencia al tratamiento con tamoxifeno, entre otros (Figura 3) (MacGregor y Jordan, 1998; Chu y DeVita, 2007).

Al igual que los estrógenos, el tamoxifeno ayuda a prevenir osteoporosis y fracturas en mujeres postmenopáusicas, así como a disminuir los niveles sanguíneos de colesterol. Sin embargo, el uso prolongado de tamoxifeno incrementa ligeramente el riesgo de trombosis y embolias pulmonares (MacGregor y Jordan, 1998; Smith et al., 2000). Adicionalmente, se ha asociado el uso del tamoxifeno con un alto riesgo de cáncer endometrial cuando se administra como agente quimiopreventivo (Fornander et al., 1989).

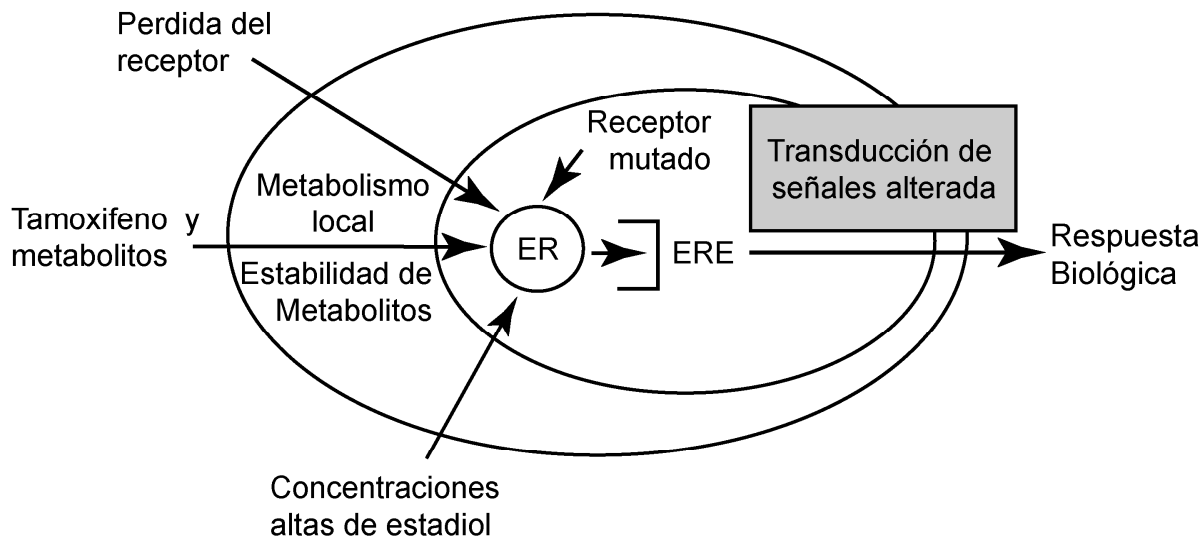


Figura 3. Posibles mecanismos de resistencia a tamoxifeno. Modificado de MacGregor y Jordan, 1998.

Cisplatino

El cisplatino (Figura 4) es un fármaco que induce muerte celular principalmente al unirse covalentemente al nitrógeno 7 de la guanina en el ADN, originando cambios conformacionales que interfieren con la duplicación y transcripción (Cepeda et al., 2007). Después de que este fármaco entra a la célula por transporte pasivo, activo o bien a través de los transportadores de cobre, el cisplatino reemplaza los átomos de cloro por moléculas de agua. Esta molécula cargada positivamente es capaz de interactuar con moléculas nucleofílicas dentro de la célula, incluyendo ADN, ARN y proteínas (Rabik y Dolan, 2007). Se sabe que el cisplatino puede unirse a fosfolípidos de la membrana celular, proteínas con grupos tiol (R-SH) y al glutatión (GSH) (Fuertes et al., 2003). El cisplatino se emplea contra una gran variedad de tumores, entre ellos el de testículo, ovario, pulmón, cabeza y cuello, entre otros (Chu y DeVita, 2007). Adicionalmente, el cisplatino puede inducir diversos tipos de daño como ototoxicidad, neuropatía periférica, nefrotoxicidad y mielosupresión (Figura 5) (Sheikh-Hamad et al., 1997; Rabik y Dolan, 2007; McWhinney et al., 2009; Casares et al., 2012). No obstante,

la nefrotoxicidad es el efecto secundario más importante y se presenta en aproximadamente 25% de los pacientes que reciben el tratamiento (*Daugaard y Abildgaard, 1989*).

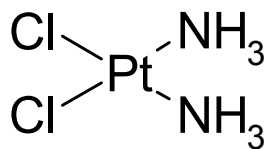


Figura 4. Estructura química del cis-diaminodicloroplatino (cisplatino, Platinol®).

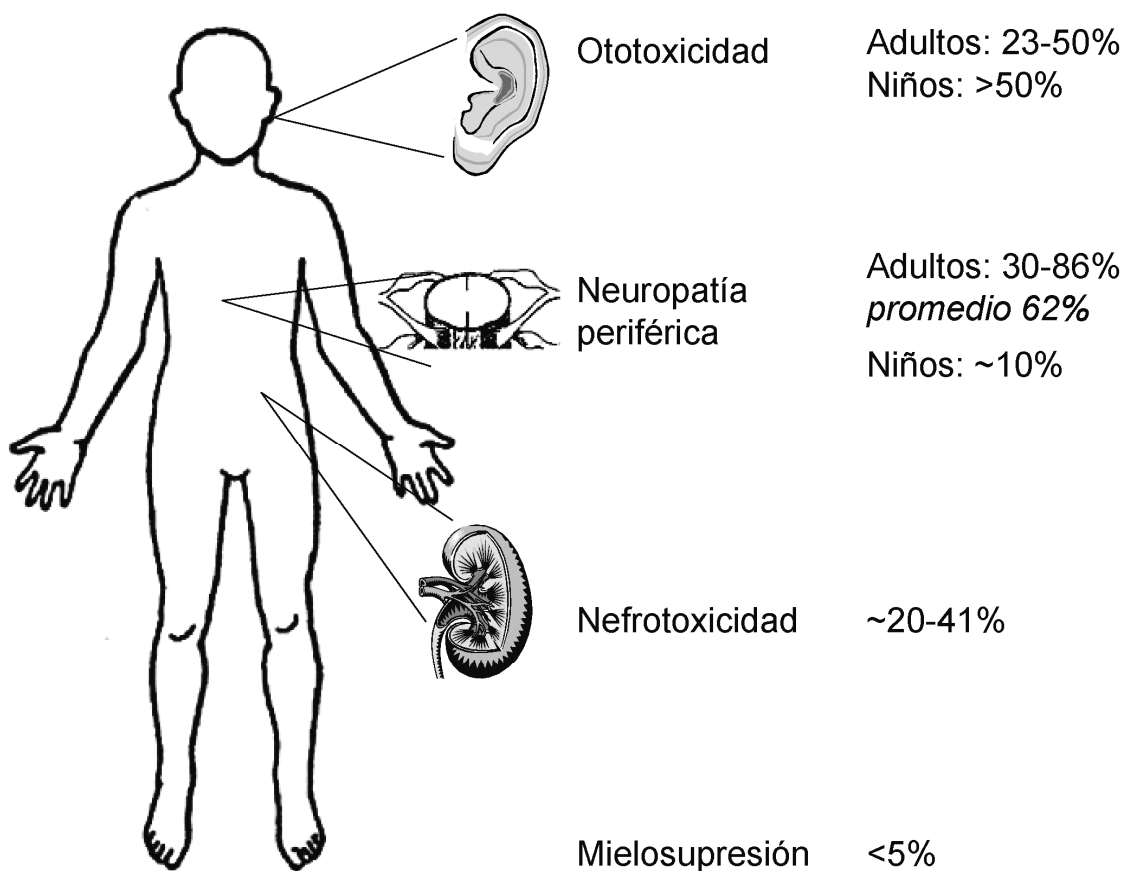


Figura 5. Toxicidad asociada al tratamiento con cisplatino. La ototoxicidad es muy frecuente en pacientes pediátricos, mientras que la mielosupresión generalmente es poco común. Modificado de Rabik y Dolan, 2007.

De 27 a 45% del cisplatino es excretado principalmente a través de los riñones dentro de los primeros 5 días posteriores a su administración y es precisamente éste órgano el que presenta mayor contenido, causando efectos nefrotóxicos (*Kawai et al., 2005*). La nefrotoxicidad es un evento secundario a la acumulación de cisplatino en los riñones, específicamente en los túbulos proximales (*Daugaard y Abildgaard, 1989; Rabik y Dolan, 2007*)

Los patrones de resistencia a cisplatino varían considerablemente dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo, se sabe que el cáncer de colon o el de células no pequeñas de pulmón son intrínsecamente resistentes al tratamiento con cisplatino. Otros tipos de cáncer como el de cabeza, cuello, testicular, de ovario o de células pequeñas de pulmón son sensibles a este tratamiento. Sin embargo, muchos de esos tipos de tumores sensibles adquieren resistencia después del tratamiento inicial (*Fuertes et al., 2003*). Entre los mecanismos de resistencia se encuentran: una disminución en la concentración intracelular de cisplatino debido a alteraciones en el transporte al interior o un aumento en su eliminación al exterior mediado por la glicoproteína P, la inactivación del cisplatino por unión a proteínas con grupos tiol, glutatión. Un incremento en la actividad de enzimas que reparan daños al ADN también puede conducir a una resistencia al tratamiento, entre otras (*Fuertes et al., 2003; Chu y DeVita, 2007*).

En la actualidad, aunque existen numerosos fármacos contra el cáncer, éstos presentan en general una alta toxicidad y en ocasiones las células tumorales son resistentes al tratamiento con éstos. Por esta razón es importante la búsqueda de compuestos que sean una nueva opción en el tratamiento del cáncer, con actividad antitumoral, más selectivos y con menos toxicidad general (*Ferlin et al., 2001*).



2. ANTECEDENTES

Entre los fármacos empleados actualmente en la quimioterapia esta la amsacrina (m-Amsa), conocido agente antiproliferativo usado para tratar leucemia aguda en adultos (*Arlin et al., 1987; Arlin et al., 1991*). Se sabe que la m-Amsa y en general, los derivados de la 9-aminoacridina inhiben la ADN topoisomerasa II (*Nelson et al., 1984; Loza-Mejía et al., 2008; Loza-Mejía et al., 2009*). El núcleo acridina de estos compuestos tiene la capacidad de intercalarse entre los pares de bases de ADN, estabilizando la ADN-topoisomerasa, generando cortes permanentes al ADN, lo que lleva a la detención del ciclo celular y la inducción de muerte celular por apoptosis (*Chilin et al., 2009*).

2.1 Tiazolo[5,4-*b*]quinolinas

Las tiazolo[5,4-*b*]quinolinas son compuestos citotóxicos que están relacionados estructuralmente con las quinolinas y acridinas por una sustitución isostérica de un anillo de benceno por un anillo tiazolo. Alvarez-Ibarra y colaboradores en 1997 sintetizaron derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, considerados análogos de la m-Amsa. Al evaluar las propiedades citotóxicas de estos compuestos en líneas tumorales humanas, los resultados indican que el compuesto 7-fluoro-2-[[*N,N*-dietilamino)etil]amino] -9-hidroxitiazolo[5,4-*b*]quinolina tiene una actividad citotóxica significativa *in vitro* contra células P-388 de leucemia murina, células A-549 de carcinoma de pulmón humano y células HT-29 de tumor de colon humano, con valores de concentraciones que disminuyen la viabilidad celular al 50% (IC₅₀) respecto al vehículo, de 1.65, 2.9 y 5 µM, respectivamente (*Alvarez-Ibarra et al., 1997*).

En 2004 Rodríguez-Loaiza y colaboradores sintetizaron nuevos derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, los cuales presentan actividad como agentes intercalantes al ADN, estos compuestos incluyen el sustituyente *N,N*-dietilamino-etil-amino en la posición 2, entre los cuales destaca el 9-anilino-2-[[*N,N*-dietilamino)etil]amino]tiazolo[5,4-*b*]quinolina, mismo que presentó actividad



citotóxica en células de leucemia mielógena crónica humana K-562 (IC_{50} 16.8 μ M) (Rodríguez-Loaiza et al., 2004).

Con el objetivo de tener nuevos compuestos con mayor actividad citotóxica, Loza-Mejía y colaboradores en 2008 y 2009 sintetizaron dos nuevas series de compuestos. En la primera serie se conserva el sustituyente *N,N*-dietilamino-etil-amino en la posición 2, mientras que en la segunda incorpora un sustituyente *N,N*-dietilamino-propil-amino en lugar del *N,N*-dietilamino-etil-amino a en la posición 2, además de probar sustituyentes electroattractores. Adicionalmente se les evaluó su actividad citotóxica en líneas tumorales humanas (Loza-Mejía et al., 2008; Loza-Mejía et al., 2009). Uno de los compuestos más activos de la segunda serie fue el “D3CLP” (Figura 6), mismo que presentó una IC_{50} de 7.8 μ M en células de leucemia K-562, de 9.72 μ M en células de cáncer de mama MCF-7, de 7.46 μ M en células de cáncer cérvico-uterino HeLa y de 10.17 μ M en células de cáncer de colon SW-620 (Loza-Mejía et al., 2009).

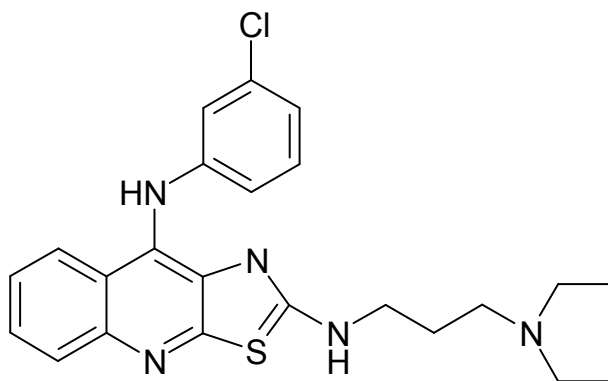


Figura 6. Estructura química del D3CLP

Se ha demostrado *in vitro* que D3CLP induce la fragmentación de ADN, se puede intercalar al ADN, inhibir la actividad de la topoisomerasa II, inducir la activación de caspasas conduciendo así a una muerte de tipo apoptótico en células de leucemia humana K-562. Además que D3CLP es mas citotóxico en células tumorales que en células no tumorales (González-Sánchez et al., 2011). Ya que el compuesto D3CLP presenta una actividad citotóxica considerable en este trabajo

consideramos importante evaluar su efecto citotóxico al combinarlo con otros antineoplásicos de uso clínico y determinar si dichas combinaciones presentan una mayor actividad citotóxica.

2.2 Combinaciones de fármacos

En ocasiones el tratamiento con un solo fármaco antineoplásico no es suficiente para tener mejorías en los pacientes con cáncer. La combinación de fármacos en el tratamiento del cáncer ha demostrado en algunos casos una mayor efectividad que el tratamiento con un solo agente antineoplásico para varios tipos de cáncer. Adicionalmente, la sobrevivencia de pacientes con cáncer que han sido tratados con combinaciones de fármacos ha sido sustancial comparado con el uso secuencial en varios tipos de leucemia, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, carcinoma de mama, pulmón, ovario y testículo (*Buchholz et al., 2007; Skeel, 2007*). Por ello es importante determinar *in vitro* el efecto de dos fármacos cuando se administran en combinación, y valorar si pueden presentar un beneficio clínico, como en el caso de encontrarse un efecto sinérgico o aditivo, o bien, si la combinación puede presentar desventajas clínicas como es el caso de un efecto antagónico.

2.2.1 Ventajas de la terapia combinada en el tratamiento del cáncer

La combinación de fármacos antineoplásicos puede prevenir la generación de clones resistentes en poblaciones celulares heterogéneas, ya que las células cancerosas pueden ser resistentes a un fármaco, pero la probabilidad de que sean resistentes a los dos fármacos es mucho menor. La terapia combinada puede ofrecer una mayor eliminación de células tumorales con menor toxicidad para el paciente, en el caso de presentarse un sinergismo. Lo anterior también puede tener un beneficio en la disminución del costo del tratamiento (*Baquiran, 2001*).



2.2.2 Métodos para evaluar el efecto combinado de fármacos

Actualmente existen dos métodos ampliamente utilizados en el estudio del efecto combinado de fármacos; el método de índice de combinación al efecto medio y el análisis isobolográfico (*Zhao et al., 2004*).

El método de índice de combinación (CI) puede emplearse para la determinación de aditividad, sinergia o antagonismo en experimentos donde se combinan dos fármacos. Este análisis fue popularizado por los trabajos de Chou y Talalay (*Chou y Talalay, 1977; Chou y Talalay, 1981; Chou y Talalay, 1983; Chou y Talalay, 1984*). Chou y Talalay derivan ecuaciones para calcular el índice de combinación al efecto medio. Para compuestos que tienen mecanismos de acción similares, donde el efecto es mutuamente excluyente el CI puede calcularse con la ecuación 1.

$$CI = (D_1) / (D_{x1}) + (D_2) / (D_{x2}) \quad \text{ecuación 1;}$$

Mientras que para pares de fármacos con mecanismos de acción diferentes o que actúan independientemente el CI puede calcularse con la ecuación 2.

$$CI = (D_1)/(D_{x1}) + (D_2) / (D_{x2}) + (D_1) (D_2) / (D_{x1}) (D_{x2}) \quad \text{ecuación 2}$$

Donde, D_{x1} y D_{x2} representan las dosis de los fármacos 1 y 2 necesarios para producir un 50% de efecto en tratamientos independientes, D_1 y D_2 representan las dosis de los tratamientos con los fármacos 1 y 2 en combinación que producen también 50% de efecto, respectivamente para cada combinación analizada en la respectiva línea celular. Si el valor de CI es cercano a 1, la interacción entre los fármacos es aditiva; valores menores a 1 indican una interacción de tipo sinérgica; y valores mayores a 1 corresponden a una interacción antagónica (*Chou y Talalay, 1984*).



Otro de los métodos ampliamente usados en el estudio del efecto combinado de fármacos es el análisis isobolográfico. Es un método válido para analizar la interacción entre dos fármacos, independientemente de su mecanismo de acción (Berenbaum, 1989). Del mismo modo que el CI, es posible distinguir tres tipos de conclusiones: 1) que no haya interacción entre los fármacos (efecto aditivo), 2) que los fármacos presenten sinergismo (efecto mayor al aditivo) o 3) que presenten un efecto antagónico (efecto menor al aditivo) (Berenbaum, 1989; Tallarida, 2001). En la Figura 7 se muestra la representación esquemática de un isoblograma para la combinación de dos fármacos, y se indican las tres posibles situaciones al evaluar su efecto combinado.

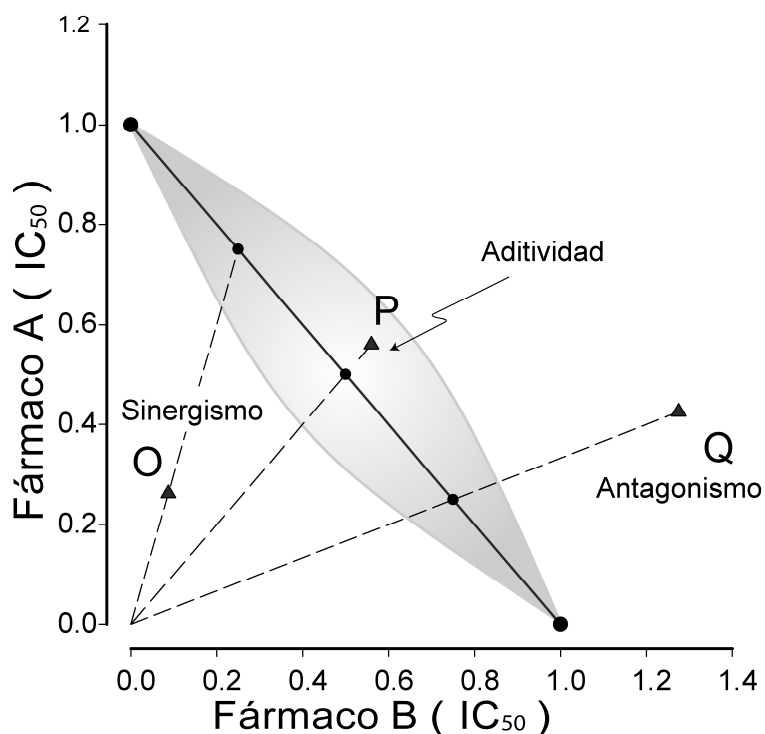


Figura 7. Representación de un isoblograma para la combinación de dos fármacos. En cada uno de los ejes se grafica la concentración de cada fármaco que produce el mismo nivel de efecto. La línea que conecta ambos puntos “línea de aditividad” representa el efecto teórico para cada par de combinaciones de ambos fármacos. Los puntos O, P y Q representan sinergismo, aditividad y antagonismo, respectivamente. Modificado de Tallarida, 2006.



2.2.3 Algunas combinaciones de fármacos estudiadas *in vitro*

Ambas metodologías antes mencionadas se han empleado para analizar el efecto combinado de fármacos antitumorales *in vitro* en múltiples estudios.

El efecto combinado de gemcitabina y etoposido fue evaluado por van Moorsel y colaboradores, usando el CI en células de Lewis de carcinoma pulmonar de ratón. La combinación de gemcitabina y etoposido en una proporción molar fija de 1:4 fue sinérgica después de 24 h de exposición (*van Moorsel et al., 1999*). Giannakakou y colaboradores en 1988 evaluaron el efecto de paclitaxel y el alcaloide de la vinca vinblastina, dos fármacos antitumorales que tienen el mismo blanco intracelular, pero con mecanismos citotóxicos opuestos. Paclitaxel es un fármaco que promueve el ensamble de los microtúbulos y los estabiliza, mientras que vinblastina inhibe la polimerización de los microtúbulos, ambos arrestan el ciclo celular en G2/M. Al evaluar el efecto combinado de dichos fármacos en células de carcinoma epidermoide KB y en células de cáncer de mama MCF-7, los resultados del análisis de índice de combinación indicaron un sinergismo cuando el segundo fármaco se administró 48 h después del primero, y cuando se administraron simultáneamente se observó un efecto antagónico (*Giannakakou et al., 1998*). Un efecto sinérgico se encontró al analizar por CI la combinación del flavonoide silibinina con doxorubicina en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB468 (*Tyagi et al., 2004*). García-López y colaboradores en 2004, evaluaron el efecto del antiestrógeno ICI 182,780 en combinación con cisplatino en varias líneas celulares de cáncer cérvico-uterino. El efecto de la combinación de ICI 182,780 con cisplatino resultó sinérgico al evaluarse por CI en varias proporciones en células HeLa, SiHa y CaSki (*García-López et al., 2004*). Una potenciación del efecto antiproliferativo se presentó al combinar cisplatino con el antagonista del receptor a progesterona en células HeLa cuando cisplatino se encontraba en mayor proporción y antagónico cuando la proporción de cisplatino era menor respecto a mifepristona; no se observó efecto sinérgico para esta combinación de fármacos en células CaSki, al analizarlas mediante el CI (*Jurado*

et al., 2009). Sorafenib es un compuesto promisorio para el tratamiento del carcinoma hepático. Sin embargo, ha presentado toxicidad, por lo que se han buscado nuevas alternativas para su uso en el tratamiento del cáncer. Al evaluar el efecto combinado del sorafenib con el inhibidor de la ciclo-oxigenasa-2 Celecoxib en las líneas celulares HepG2 y HuH7 de carcinoma hepático, se encontró que el efecto combinado se potencia, al analizarlo por el CI (*Morisaki et al., 2013*).

La interacción citotóxica del fármaco gefinitib dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) y el inhibidor selectivo del proteasoma bortezomib fue evaluada por Kusumoto y colaboradores en 2009, en células de PC-9 de cáncer de pulmón humano. El análisis isoblográfico de la combinación de dichos fármacos presentó un efecto aditivo en ausencia del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y un efecto sinérgico en presencia del TNF- α después de 4 días de tratamiento (*Kusumoto et al., 2009*). La combinación del miembro de la familia de los ligandos del factor de necrosis Apo-2L con el inhibidor de la topoisomerasa II doxorubicina fue evaluada por Mizutani y colaboradores en 1999, en células de cáncer de vejiga humana T24, J82 y HT1197. Solamente, el tratamiento de la línea celular T24 con Apo-2L y doxorubicina presentó un efecto sinérgico al evaluarlo por análisis isoblográfico (*Mizutani et al., 1999*). Han y colaboradores en 2012, evaluaron el efecto combinado del inhibidor de geranylgeranil transferasa (GGTI) con el estabilizante de microtúbulos docetaxel en células de cáncer de próstata LNCaP, PC3, y DU145. Se observó un efecto sinérgico para un amplio rango de concentraciones de dichos fármacos, sugiriendo que esta combinación puede tener un efecto benéfico en el tratamiento del cáncer de próstata (*Han et al., 2012*).

Adicionalmente, el análisis isoblográfico se ha empleado para estudiar la interacción de diversos fármacos, no sólo antitumorales. Por ejemplo, Ugalde y colaboradores en 2005 ha estudiado mediante isoblogramas la combinación del



extracto hidro-alcohólico de *Valeriana edulis* con seis fármacos depresores del sistema nervioso central (SNC) (Ugalde et al., 2005).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial, el cáncer es un problema de salud pública muy importante, ya que es la principal causa de muerte (OMS, 2013). Los fármacos empleados en la quimioterapia del cáncer, en general presentan alta toxicidad y en algunos casos su costo es muy elevado. Por lo anterior, es necesaria la evaluación de nuevas moléculas que puedan ser una alternativa contra el cáncer.

Adicionalmente, la combinación de fármacos en el tratamiento del cáncer ha demostrado en algunos casos una mayor efectividad que el tratamiento con un solo agente antineoplásico para varios tipos de cáncer. Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto combinado del derivado de tiazolo[5,4-*b*]quinolina sintético D3CLP con tres de los antineoplásicos más ampliamente usados en la clínica para tratar tres tipos cánceres de alta prevalencia en México, como son: la leucemia, el cáncer de mama y el cáncer cérvico-uterino (Ferlay et al., 2010).



4. HIPÓTESIS

- La citotoxicidad *in vitro* será mayor al combinar el compuesto D3CLP con los fármacos tamoxifeno, imatinib o cisplatino, que cuando se utilizan en forma individual en líneas celulares de cáncer de mama, leucemia y cáncer cérvico-uterino.

5. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar *in vitro* el efecto citotóxico de la combinación del compuesto D3CLP con otros fármacos de uso clínico.

5.1 Objetivos Particulares

- Determinar la actividad citotóxica individual de D3CLP y los fármacos de uso clínico tamoxifeno, imatinib y cisplatino en líneas celulares de cáncer de mama leucemia y de cáncer cérvico-uterino, respectivamente.
- Evaluar la actividad citotóxica de D3CLP en combinación con tamoxifeno, imatinib o cisplatino en tres proporciones, en líneas celulares de cáncer de mama, leucemia y de cáncer cérvico-uterino, respectivamente.
- Analizar el efecto de la combinación de D3CLP más tamoxifeno, imatinib o cisplatino, mediante el índice de combinación e isobogramas.
- Explorar el tipo de muerte celular inducida por la combinación de fármacos más activa, en la respectiva línea celular.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Líneas celulares

Se emplearon líneas celulares de leucemia (K-562), cáncer de mama (MCF-7) y de cáncer cérvico-uterino (HeLa).

Fármacos analizados

D3CLP (9-[(3-cloro)fenilamino]-2-[3-(dietilamino)propilamino]tiazolo[5,4-*b*]quinolina), PM: 439 g/mol, sintetizado en el Laboratorio del Dr. Alfonso Lira Rocha, Facultad de Química UNAM. Cisplatino (BLASTOLEM® RU, Lemery Laboratories). Tamoxifeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Imatinib mesylate (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

Medio de cultivo.

Medio DMEM*	10 g (1 sobre)
L-Piruvato* 100X	10 mL
Antibiótico-antimicótico* 100X	10 mL
Aminoácidos no esenciales* 100X	10 mL
NaHCO ₃	63.3 mM
HEPES	9.23 mM
Agua desionizada estéril cbp	900 mL

*Gibco-Invitrogen

La preparación se realizó en una campana de flujo laminar utilizando material estéril. En un vaso de precipitado (1 L) se disolvió el sobre de medio de cultivo en 700 mL de agua desionizada junto con los otros complementos sólidos usando un agitador magnético. Se adicionaron los constituyentes líquidos, se agitó y se adicionó agua desionizada suficiente para completar 900 mL. Se esterilizó por filtración el medio a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22 µm. Se complementó con 10% de suero de bovino fetal (SFB) inactivado, 100 µg/mL



de penicilina G sódica y 0.25 µg/mL de estreptomina (GIBCO®). Los frascos se conservaron bien cerrados y en refrigeración. Para verificar su esterilidad, se colocó una alícuota del medio en una caja Petri estéril (control de esterilidad) y se incubó a 37°C por varios días.

Medio para conservar células en congelación

Medio de cultivo DMEM complementado	95%
DMSO	5%

Los componentes se homogenizaron en un tubo de centrifuga estéril y se conservaron en refrigeración hasta su uso.

PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
Agua destilada cbp	1 L

Se preparó un litro de solución amortiguadora con las sales mencionadas. En caso necesario, se ajustó el pH a 7.4. Se esterilizó en autoclave.

PBS-EDTA (Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA)

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH ₂ PO ₄	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	10.14 mM
EDTA	1 mM
Agua destilada cbp	1 L



Se preparó un litro de solución amortiguadora con las sales mencionadas. En caso, necesario se ajustó el pH a 7.4. Se esterilizó en autoclave.

Solución de MTT (2.5 mg /mL)

MTT	125 mg
PBS cbp	50 mL

Se pesó el MTT en un tubo de 50 mL estéril empleando guantes y cubre bocas ya que es un compuesto tóxico. Al tubo se adicionó 25 mL de PBS para disolver el MTT. Posteriormente, se ajustó el volumen a 50 mL. Se cubrió el tubo con papel aluminio y se conservó en refrigeración hasta su uso.

Solución fijadora para TUNEL. Paraformaldehído al 4%

Paraformaldehído	2 g
PBS cbp	50 mL

Se calentaron 40 mL de PBS en vaso de precipitado a 60°C en una parrilla. Se agregó el paraformaldehído y en agitación se conservó ésta temperatura hasta que se disolvió el paraformaldehído. Se dejó enfriar y enseguida se aforó a 50 mL. La solución se guardó en refrigeración a 4°C perfectamente sellada y rotulada hasta su uso. La solución se utilizó recién preparada.

MÉTODOS

Mantenimiento del cultivo celular.

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Se utilizó material limpio y estéril en la manipulación de medio de cultivo y líneas celulares. Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas Petri de plástico estériles, con medio de cultivo DMEM complementado con 10% de suero de bovino fetal el cual se cambió cada tercer día o según se requirió. Los cultivos se incubaron en un ambiente con 5% CO₂, con una humedad relativa del 98%, a 37°C (condiciones óptimas para el cultivo celular). El



cambio del medio de cultivo se realizó de la forma siguiente: ya que las líneas celulares son adherentes, se eliminó el medio de cultivo por decantación. Las células adheridas a la caja Petri se lavaron con una solución de PBS-EDTA, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de detritos, y se observaron al microscopio. Finalmente, se adicionó medio fresco y las células se volvieron a incubar.

Propagación de líneas celulares

Cuando las líneas celulares llegaron a una confluencia de 90% (cantidad de células que ocupan el 90% de la superficie de la placa), se propagaron en otra caja Petri para disminuir su confluencia y así evitar la saturación. Para ello, se eliminó por decantación el medio de cultivo de la caja, las células adheridas se lavaron con PBS y posteriormente, se incubaron en PBS-EDTA durante 5 minutos o hasta que presentaron cambio a una morfología esférica. Las células que permanecieron adheridas se desprendieron con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, se inoculó una caja de Petri con medio de cultivo previamente atemperado a 37°C con la línea celular respectiva y se distribuyeron las células con movimientos circulares suaves, previo a su incubación.

Conteo celular

Para el conteo celular se empleó una cámara de Neubauer, la cual se limpió con etanol al 70%. Se tomó una alícuota de una suspensión celular y se colocó en la cámara de Neubauer. El conteo de las células se realizó en un microscopio invertido, contando en los cuadrantes correspondientes para la cuenta de linfocitos. Una vez obtenido el promedio se aplicó la siguiente fórmula para determinar el número de células por mililitro.

$$\text{Células /mL} = (\text{promedio células}) \times [1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}]$$

Obtenido el número de células por mililitro se calculó el volumen de suspensión adecuado para agregar en cada caja o pozo, respectivamente de acuerdo al



experimento. En los ensayos de actividad citotóxica se inocularon 7000 células por pozo en placas de 96 pozos, mientras que en los ensayos de TUNEL se inocularon 5×10^5 células en placas de Petri de 60 mm.

Conservación de células en congelación.

Antes de congelar las células debían estar refringentes y con una confluencia del 90% al 95%. Se procedió como se indica en el apartado de propagación celular hasta obtener la suspensión celular, la cual se colectó en un tubo y se centrifugó a 800 rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con el medio de congelamiento suavemente. Se congelaron aproximadamente $1.2-2 \times 10^6$ células por 1 mL de medio de congelación. Los criotubos se congelaron en posición vertical a -70°C por 24 h o fueron transferidos a -196°C en nitrógeno líquido para conservarlas por tiempo indefinido.

Descongelación de células.

Las células se descongelaron frotando el criotubo con la mano, se centrifugó a 800 RPM durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio DMEM. Esta suspensión celular en medio se colocó en una caja Petri de 60 mm y se incubó como se indicó anteriormente.

Preparación de disoluciones de compuestos.

Los fármacos D3CLP, imatinib y tamoxifeno se pesaron y se disolvieron en DMSO. Solamente el cisplatino se utilizó en solución salina (presentación farmacéutica). Se calculó la concentración de cada disolución y se realizaron diluciones en los casos necesarios, las cuales se conservaron protegidas de la luz y a 4°C , a excepción del cisplatino que se conservó a temperatura ambiente.



Análisis de citotoxicidad en tratamientos con un solo fármaco.

La viabilidad celular se puede determinar empleando sales de tetrazolio, como el MTT. Estas sales amarillas, son reducidas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciendo formazán, que en medio acuoso es insoluble y por lo tanto forma cristales. La reducción ocurre solamente en células vivas, lo que permite evaluar la viabilidad al compararlo con el control respectivo (*Carmichael et al., 1988; Kumi-Diaka et al., 1998; Lawrence et al., 2001*).

Para determinar la citotoxicidad de los antineoplásicos *in vitro* se cultivaron las líneas celulares K-562, MCF-7 y HeLa en medio DMEM (en presencia de CO₂ al 5% y una humedad relativa del 98%). Las células se contaron en una cámara de Neubauer, se colocaron en placas de 96 pozos por sextuplicado 5X10⁵ células por pozo, en un volumen de 200 µL de la respectiva suspensión celular. Se trataron cultivos de las líneas celulares antes mencionadas con diferentes concentraciones de D3CLP, imatinib, tamoxifeno y cisplatino, respectivamente y con el vehículo (DMSO o PBS). Las células se incubaron con los tratamientos durante 48 h en condiciones óptimas para el cultivo celular. Posteriormente se determinó colorimétricamente la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT, para lo cual se les adicionaron 20 µL de solución de MTT a cada pozo y se incubó nuevamente a 37°C durante al menos 2 h. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 100 µl de DMSO a cada pozo para disolver los cristales de formazán con ayuda de una micropipeta. Se determinó la absorbancia a 540 nm para cada tratamiento.

El porcentaje de viabilidad se calculó en relación a las células sin tratamiento y de acuerdo a la fórmula $\% \text{ Viabilidad} = 100 \times (A_F / A_C)$, donde: A_F es la absorbancia de las células tratadas con el correspondiente fármaco, A_C es la absorbancia de las células sin tratamiento

Posteriormente se determinó para cada fármaco la concentración que produce una disminución de la viabilidad celular al 50% (IC₅₀) respecto al vehículo,



mediante un análisis de regresión no lineal a partir de los datos de viabilidad celular relativos a cada dosis del fármaco respectivo, empleando el programa OriginPro® 7.0. El valor final de IC₅₀ es resultado del promedio de al menos tres experimentos independientes.

En la determinación de la actividad citotóxica en células MCF-7 se empleó suero sin hormonas tratado con carbón activado-dextran y medio sin rojo fenol.

Determinación de la actividad citotóxica de fármacos en combinaciones.

La actividad citotóxica de las combinaciones se realizó considerando las IC₅₀ respectivas, determinadas en el apartado anterior. Se propuso evaluar combinaciones de los fármacos en 3 proporciones, tomando como base el valor de IC₅₀ para cada fármaco. Para la combinación en una proporción 3:1, los fármacos fueron dosificados como sigue: $0.75 \times IC_{50A}$ más $0.25 \times IC_{50B}$, donde IC_{50A} es la IC₅₀ del D3CLP e IC_{50B} es la IC₅₀ para el otro fármaco antineoplásico en la misma línea celular. Adicionalmente se consideraron dos dosis mayores y dos dosis menores en proporción geométrica, para poder determinar la actividad citotóxica de la combinación en cuestión (Tabla 2). Tratamientos similares fueron considerados para las combinaciones en proporción 1:1 ($0.5 \times IC_{50A}$ más $0.5 \times IC_{50B}$) y en proporción 1:3 ($0.25 \times IC_{50A}$ más $0.75 \times IC_{50B}$) (Tabla 3 y 4). En la evaluación de los tratamientos combinados, los fármacos fueron administrados a las respectivas células uno inmediatamente después del otro y se incubaron durante 48 h en condiciones estándar para el cultivo celular. Posteriormente, mediante el análisis con MTT se calculó el porcentaje de células viables y se determinó el respectivo valor de IC₅₀ para la combinación en cuestión. Los tratamientos se realizaron al menos por triplicado para cada proporción analizada y para cada línea celular.



Tabla 2. Combinación de D3CLP con cada fármaco de uso clínico en proporción 3:1.

3 IC ₅₀ D3CLP	+	1 IC ₅₀ "X"	→	4 IC ₅₀
1.5 IC ₅₀ D3CLP	+	0.5 IC ₅₀ "X"	→	2 IC ₅₀
0.75 IC₅₀ D3CLP	+	0.25 IC₅₀ "X"	→	1 IC₅₀
0.375 IC ₅₀ D3CLP	+	0.125 IC ₅₀ "X"	→	0.5 IC ₅₀
0.1875 IC ₅₀ D3CLP	+	0.0625 IC ₅₀ "X"	→	0.25 IC ₅₀

X; tamoxifeno, imatinib o cisplatino.

Tabla 3. Combinación de D3CLP con cada fármaco de uso clínico en proporción 1:1.

2 IC ₅₀ D3CLP	+	2 IC ₅₀ "X"	→	4 IC ₅₀
1 IC ₅₀ D3CLP	+	1 IC ₅₀ "X"	→	2 IC ₅₀
0.5 IC₅₀ D3CLP	+	0.5 IC₅₀ "X"	→	1 IC₅₀
0.25 IC ₅₀ D3CLP	+	0.25 IC ₅₀ "X"	→	0.5 IC ₅₀
0.125 IC ₅₀ D3CLP	+	0.125 IC ₅₀ "X"	→	0.25 IC ₅₀

X; tamoxifeno, imatinib o cisplatino.

Tabla 4. Combinación de D3CLP con cada fármaco de uso clínico en proporción 1:3.

1 IC ₅₀ D3CLP	+	3 IC ₅₀ "X"	→	4 IC ₅₀
0.5 IC ₅₀ D3CLP	+	1.5 IC ₅₀ "X"	→	2 IC ₅₀
0.25 IC₅₀ D3CLP	+	0.75 IC₅₀ "X"	→	1 IC₅₀
0.125 IC ₅₀ D3CLP	+	0.375 IC ₅₀ "X"	→	0.5 IC ₅₀
0.0625 IC ₅₀ D3CLP	+	0.1875 IC ₅₀ "X"	→	0.25 IC ₅₀

X; tamoxifeno, imatinib o cisplatino.

Evaluación del índice de combinación al efecto medio.

El efecto de las combinaciones fue estudiado por el método de índice de combinación al efecto medio, o sea, a una concentración teórica que produce una



inhibición del 50% de la proliferación celular. El índice de combinación fue determinado como $CI_x = (D_1)/(D_{x1}) + (D_2)/(D_{x2}) + \alpha(D_1)(D_2)/(D_{x1})(D_{x2})$, donde CI_x es el índice de combinación (CI) para una viabilidad del 50% (50% de efecto), D_{x1} y D_{x2} representan las dosis de los fármacos 1 y 2 necesarios para producir un 50% de efecto en tratamientos independientes, D_1 y D_2 representan las dosis de los tratamientos con los fármacos 1 y 2 en combinación que producen también 50%, respectivamente para cada combinación analizada en la respectiva línea celular. Para fármacos que actúan mediante mecanismos de acción similares $\alpha=1$, y para fármacos con diferentes mecanismos de acción $\alpha=0$. En la determinación del índice de combinación, se consideró que el par de fármacos analizados en combinación tienen diferentes mecanismos para inducir la muerte celular ($\alpha=0$). Si el valor de CI es cercano a 1, la interacción entre los fármacos es aditiva; valores menores a 1 indican una interacción de tipo sinérgica; y valores mayores a 1 corresponden a una interacción antagónica (*Chou y Talalay, 1984*).

Análisis isoblográfico.

Adicionalmente se realizó un análisis isoblográfico de la combinación de D3CLP con los fármacos de uso clínico. Se construyeron isoblogramas, en el cual se graficaron dosis equipotentes de D3CLP y del otro fármaco antineoplásico fueron graficadas. La línea que conecta esos puntos corresponde a la línea de aditividad y representa el valor de la IC_{50} teórica para cada par de posibles combinaciones de esos fármacos. Posteriormente se representó el valor experimental de IC_{50} para la combinación en cuestión, obtenido de la curva dosis-respuesta. El lugar en la gráfica donde se ubica el valor experimental determina el tipo de interacción, para una combinación dada. Si el valor experimental se ubica por debajo de la línea de aditividad y es estadísticamente diferente de un efecto aditivo, entonces el efecto observado para la combinación es sinérgico. Si el valor experimental se ubica en la línea de aditividad, entonces se observa un efecto aditivo. Por otro lado, si el efecto experimental se ubica por arriba de la línea de aditividad y es estadísticamente diferente de un efecto aditivo, entonces el efecto observado es antagónico (*Tallarida, 2001; Tallarida, 2006*).



Este análisis se realizó para cada par de fármacos combinados y evaluados en las respectivas líneas celulares. Para cada combinación se graficaron los valores de IC₅₀ teóricas y experimentales, incluyendo valores de error estándar para cada dato empleando el programa Sigmaplot® 11.

Determinación de fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL.

Para explorar el posible mecanismo de muerte celular inducido por el tratamiento citotóxico más activo se implementó el ensayo de TUNEL (del inglés, TdT-mediated dUTP nick end labeling), el cual marca los extremos 3'OH del ADN *in situ*, por medio de una enzima transferasa de nucleótidos terminal (TdT). En procesos de muerte celular se produce fragmentación de ADN, generando extremos 3'OH susceptibles de ser marcados, por ejemplo con nucleótidos marcados con fluoresceína. Además de marcar ADN fragmentado, el ensayo de TUNEL nos permite observar otras características sugerentes de muerte por apoptosis, como condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y la presencia de cuerpos apoptóticos (*Gavrieli et al., 1992; Kaufmann et al., 2000*).

Para analizar la fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL, se sembraron 5×10^5 células HeLa en cajas Petri de 6 cm de diámetro 24 h antes de iniciar los diferentes tratamientos, las cuales contenían cubreobjetos redondos de 9 mm de diámetro (laminillas). Se trataron las células con D3CLP (8.5 μ M), cisplatino (15.6 μ M), la combinación de D3CLP mas cisplatino en una proporción 3:1 con base a sus respectivas IC₅₀ (6.6 μ M de D3CLP más 3.9 μ M de cisplatino), como control negativo se emplearon células HeLa tratadas con el vehículo (DMSO). Cada uno de los tratamientos anteriores se incubó en condiciones estándar para el cultivo celular durante 12, 24, 36 y 48 h, respectivamente.

Terminado el tiempo de incubación indicado anteriormente, se recolectó una laminilla con células tratadas con el respectivo fármaco. Las células adheridas a cada laminilla se trataron con cuidado para no desprenderlas. Cada caja fue



lavada con PBS frío y se fijó con paraformaldehído al 4% durante 45 minutos. Posteriormente, se realizaron nuevamente dos lavados con PBS. Las laminillas en las cajas Petri se conservaron en 5 mL de PBS a 4°C hasta su procesamiento posterior.

Cuando se habían colectado todas las laminillas de cada uno de los tratamientos se procesaron las muestras para la técnica de TUNEL empleando “In situ cell death detection kit, fluorescein®”, Roche (Cat. No.11 648 795 910) y siguiendo las indicaciones para su uso. Para lo cual se tomó una laminilla de cada tratamiento y se colocó en una placa de 12 pozos. Las placas con las laminillas se colocaron sobre hielo antes de permeabilizar las células con 0.1% de tritón X-100 en citrato de sodio 0.1% durante dos minutos. Las laminillas se lavaron nuevamente con PBS. A las demás muestras con los tratamientos se les adicionó 30 µL de la mezcla de reacción de TUNEL y se incubaron 60 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda y en oscuridad. Se realizaron lavados con PBS. Las laminillas secas se montaron en portaobjetos con *DAKO Fluorescent Mounting Medium®*. Para su análisis por microscopía de fluorescencia. Se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm y se detectó la fluorescencia a 520 nm (longitud de emisión, verde).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se presentan como el promedio \pm error estándar, de al menos tres experimentos. Los datos del análisis isoblográfico se analizaron para su significancia estadística con la prueba “t” de *student*.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de la citotoxicidad de fármacos solos en líneas celulares

Una de las primeras evaluaciones biológicas que se les debe hacer a los compuestos para determinar si pueden llegar a representar nuevos fármacos antitumorales es caracterizar su citotoxicidad *in vitro* en diversas líneas celulares. Adicionalmente para poder determinar si el efecto combinado de dos fármacos es de tipo sinérgico, aditivo o antagónico, es necesario conocer el efecto individual de cada uno de los fármacos en estudio. Para esto, líneas celulares de leucemia K-562, cáncer de mama MCF-7 y de cáncer cérvico-uterino HeLa, correspondientes a los tipos de cáncer de alta incidencia en México fueron tratadas con D3CLP y los antineoplásicos de uso clínico. La viabilidad celular a 48 h de exposición a los tratamientos fue determinada mediante la técnica de MTT. La Tabla 5 resume las concentraciones que producen una disminución de la viabilidad celular al 50% (IC₅₀) para los fármacos considerados.

Tabla 5. Citotoxicidad de los fármacos en líneas celulares.

Fármaco	Línea celular	^a IC ₅₀ (μM)
D3CLP	K-562	8.55±1.29
	MCF-7	11.22±1.45
	HeLa	8.81±1.17
imatinib	K-562	2.37±0.12
tamoxifeno	MCF-7	22.71± 1.59
cisplatino	HeLa	15.62±0.48

^a Promedios de IC₅₀±error estándar correspondientes a al menos 4 experimentos independientes.

A partir de los valores de IC₅₀ se observó que las líneas celulares más sensibles al tratamiento con D3CLP son las de leucemia y cáncer cérvico-uterino, mientras que la menos sensible fue la línea de cáncer de mama. Dichos valores son muy cercanos los valores de IC₅₀ previamente determinados para otras líneas celulares (Loza-Mejía *et al.*, 2009; González-Sánchez *et al.*, 2011). Por otro lado, el valor de IC₅₀ para células HeLa tratadas con cisplatino a 48 h presentó un valor



ligeramente menor comparado con el previamente reportado por Marzano y colaboradores en 2004, que es de 18.64 μM (Marzano *et al.*, 2004). La única diferencia es que este último valor fue determinado a 24 h de exposición y al incrementar el tiempo de exposición se espera que el valor de IC_{50} disminuya como se observa en la Tabla 5. Adicionalmente, lo anterior puede deberse a diferencias entre la fuente del compuesto empleado, así como el uso de diferentes clonas de la misma línea celular empleada. Por esto se consideró determinar los valores de las respectivas IC_{50} para cada fármaco antitumoral en la respectiva línea celular, tomando sólo como referencia los datos publicados, según sea el caso.

7.2 Estudio de la actividad citotóxica en líneas celulares de la combinación de D3CLP con antineoplásicos de uso clínico en tres proporciones

La evaluación del efecto combinado de fármacos antitumorales ha sido ampliamente determinada por el índice de combinación al efecto medio y por análisis isoblográfico (Janss *et al.*, 1998; García-López *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Tonra *et al.*, 2006; Yunos *et al.*, 2011; de Brito Galvao *et al.*, 2012; Rathos *et al.*, 2012). Para determinar el efecto combinado de D3CLP con los fármacos de uso clínico, se trataron las líneas celulares indicadas, con la combinación de D3CLP más los fármacos respectivos, en proporciones 3:1, 1:1 y 1:3 tomando como base sus valores de IC_{50} en tratamientos únicos. Se determinó nuevamente la viabilidad celular después de 48 h de exposición a los fármacos. Los valores de IC_{50} obtenidos para cada combinación se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Actividad citotóxica para la combinación de D3CLP con los antineoplásicos de uso clínico.

Tratamiento		IC ₅₀ (μM)		
Células	D3CLP más	3:1	1:1	1:3
K-562	imatinib	4.24±0.47	3.59±0.36	3.34±0.43
MCF-7	tamoxifeno	17.74±3.1	19.06±3.4	20.58±2.94
HeLa	cisplatino	6.45±0.86	9.05±1.36	14.91±3.27

Los valores de IC₅₀ ± error estándar corresponden a tres experimentos independientes.

Tanto de los datos de IC₅₀ para los tratamientos con un solo fármaco, como de los valores de IC₅₀ para las combinaciones es complicado saber si las combinaciones evaluadas producen un efecto sinérgico, aditivo o antagónico, por lo que se realizaron dos tipos de análisis para determinar el tipo de efecto que producían las combinaciones evaluadas.

7.3 Análisis del efecto combinado de fármacos mediante el CI

A partir de los datos de viabilidad correspondientes para cada dosis de los tratamientos con un solo fármaco y para pares de fármacos en combinación, se determinó el efecto de las combinaciones de D3CLP con los antineoplásicos de uso clínico por el método de índice de combinación para el efecto medio (*Chou y Talalay, 1983*). Esto es, se calculó el índice de combinación a una concentración teórica que produce una inhibición del 50% de la proliferación. El valor de CI puede ser menor a 1, cercano a 1 o mayor a 1, lo que indica un efecto sinérgico, aditivo o antagónico, respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 7, donde se observa que la combinación de D3CLP más imatinib en una proporción de 3:1 y 1:1 en células K-562 presentó un efecto sinérgico. La misma combinación de fármacos en una proporción de 1:3 presentó un efecto antagónico, en esa línea celular de leucemia.



Tabla 7. Índice de combinación al efecto medio (CI) para las combinaciones de D3CLP más fármacos de uso clínico en líneas celulares.

Tratamiento		CI		
Células	D3CLP más	3:1	1:1	1:3
K-562	imatinib	0.69	0.86	1.20
MCF-7	tamoxifeno	1.20	1.26	1.22
HeLa	cisplatino	0.85	1.04	1.06

CI<1, CI=1 y CI>1; representan un efecto sinérgico, aditivo o antagónico, respectivamente. Ver Materiales y Métodos.

Solo en el caso de las células MCF-7 tratadas con D3CLP más tamoxifeno se observó un efecto antagónico en todas las proporciones analizadas. Por otro lado, un efecto sinérgico también se observó para el tratamiento de células HeLa con D3CLP más cisplatino en una proporción 3:1, para las otras proporciones de esta misma combinación en células HeLa se observó un efecto aditivo (Tabla 7).

Al analizar el efecto combinado de fármacos mediante el CI se han observado diversos tipos de efectos que van desde efectos sinérgicos hasta antagónicos, para un mismo par de fármacos combinados en diferentes proporciones. Al evaluar la combinación de cisplatino más ICI182,780 en células de cáncer cérvico-uterino SiHa se presentó un efecto sinérgico en un amplio rango de proporciones de cisplatino e ICI182,780 (*García-López et al., 2004*). Jurado y colaboradores en 2009 evaluaron el efecto a diferentes concentraciones de cisplatino manteniendo fija la concentración de mifepristona a 10 μM en células HeLa. Un efecto antagónico se observó cuando cisplatino se encontraba en una concentración de 0.1-3.3 μM y un efecto sinérgico cuando el cisplatino se encontraba en una concentración de 10-100 μM (*Jurado et al., 2009*). Por lo cual no es de extrañar que en el presente estudio se hayan encontrado efectos sinérgicos y antagónicos para la combinación de D3CLP con imatinib en células K-562. Esta situación también se presentó para la combinación de D3CLP con cisplatino en células HeLa.

7.4 Análisis isoblográfico para la combinación de D3CLP con los fármacos de uso clínico

Adicionalmente se realizó el análisis isoblográfico para el efecto de las combinaciones de D3CLP más imatinib, tamoxifeno o cisplatino en las tres líneas celulares K-562, MCF-7 y HeLa, respectivamente. Se construyeron los isobogramas para el efecto de D3CLP con los otros fármacos indicados considerando los valores de IC_{50} para cada combinación y proporción de D3CLP con los antineoplásicos de uso clínico (Tabla 6), graficando la contribución al efecto debido a cada fármaco en combinación. También se incluyeron los valores de IC_{50} para cada fármaco individual (Tabla 5) obtenidos en las respectivas líneas celulares.

Como se describió con anterioridad, en la Figura 7 se muestra una representación esquemática de un isoblograma. Cuando el efecto de una combinación se encuentra por debajo de la línea de aditividad se presenta un efecto sinérgico (punto *P*), cuando el efecto de una combinación se encuentra por encima de dicha línea se presenta un efecto antagónico (punto *R*), si el efecto de la combinación esta cerca de la línea isoefectiva se presenta un efecto aditivo (punto *Q*).

Los resultados del análisis isoblográfico en células K-562 tratadas con la combinación de D3CLP más imatinib ubican al efecto de las combinaciones en proporción 3:1 y 1:1 por debajo de la línea de aditividad, sugiriendo un efecto sinérgico del mismo modo que se observó mediante el índice de combinación. Para la combinación de estos mismos fármacos en proporción 1:3 el efecto observado por el análisis isoblográfico es de tipo aditivo, mismo que también correlaciona con el observado por el índice de combinación (Figura 8).

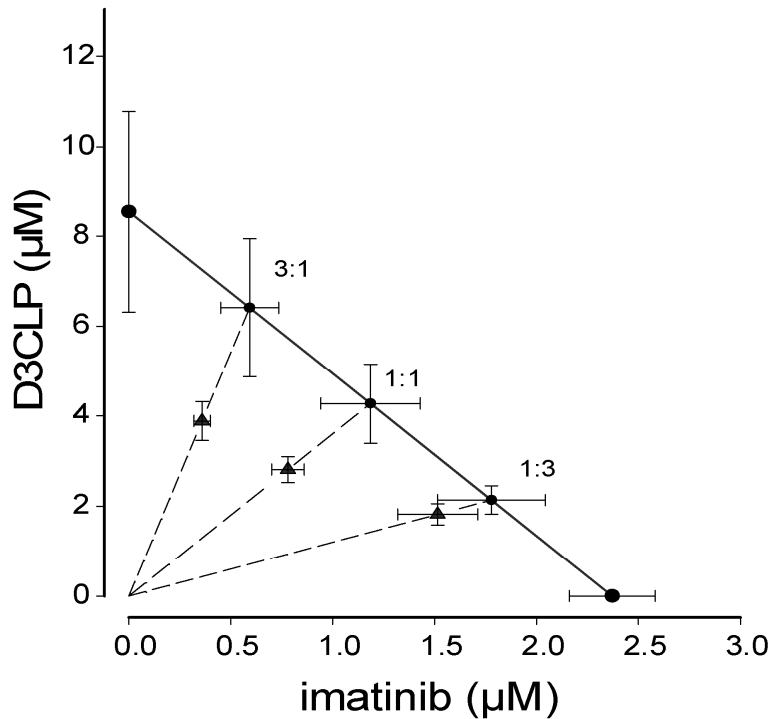


Figura 8. Isoblograma para la combinación de D3CLP con imatinib en células K-562. El tratamiento de ésta línea celular de leucemia con los fármacos en proporción 3:1 y 1:1 presentaron sinergismo.

Por otro lado, el análisis isoblográfico del tratamiento de células de cáncer de mama MCF-7 con D3CLP más tamoxifeno ubican al efecto de dicha combinación por arriba de la línea de aditividad para los fármacos en las proporciones 3:1 y 1:1, sugiriendo un efecto antagónico. Mientras que para la combinación en proporción 1:3, el efecto se ubica muy cerca de la línea de aditividad indicando un efecto aditivo (Figura 9). Adicionalmente, estos resultados correlacionan con los encontrados mediante el índice de combinación.

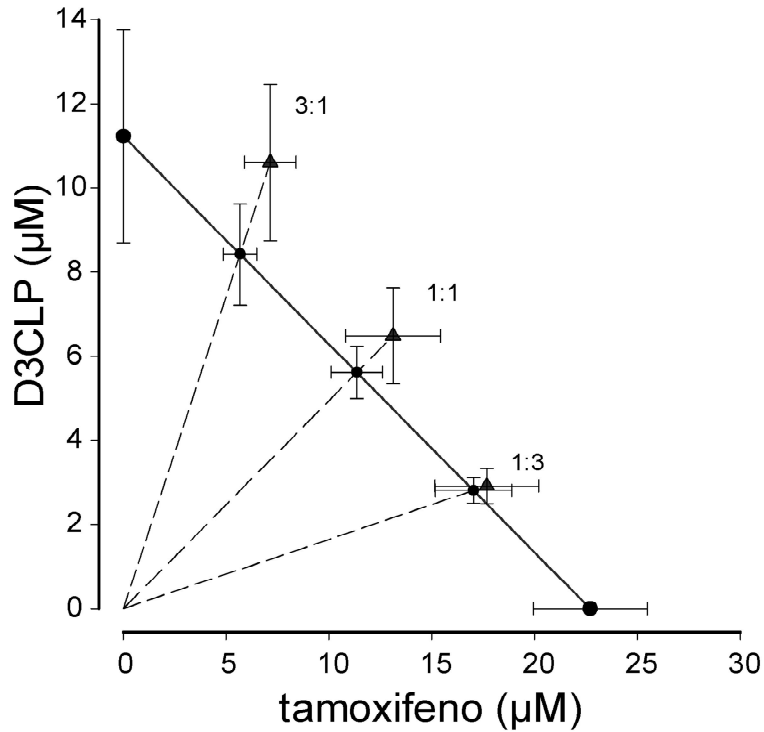


Figura 9. Isoblograma para la combinación de D3CLP con tamoxifeno en células MCF-7. El tratamiento de ésta línea celular de cáncer de mama con los fármacos sugieren un efecto aditivo.

En cuanto al análisis isoblográfico para la combinación de D3CLP más cisplatino en células HeLa, los resultados ubican al efecto de esta combinación por debajo de la línea de aditividad para la mezcla de dichos fármacos en las proporciones 3:1 y 1:1, mientras que para la proporción 1:3 el efecto se ubicó por arriba de la línea de aditividad y muy cercana a ésta (Figura 10). Interesantemente, el efecto sinérgico ejercido la combinación de D3CLP mas cisplatino en una proporción 3:1 resultó ser estadísticamente significativo.

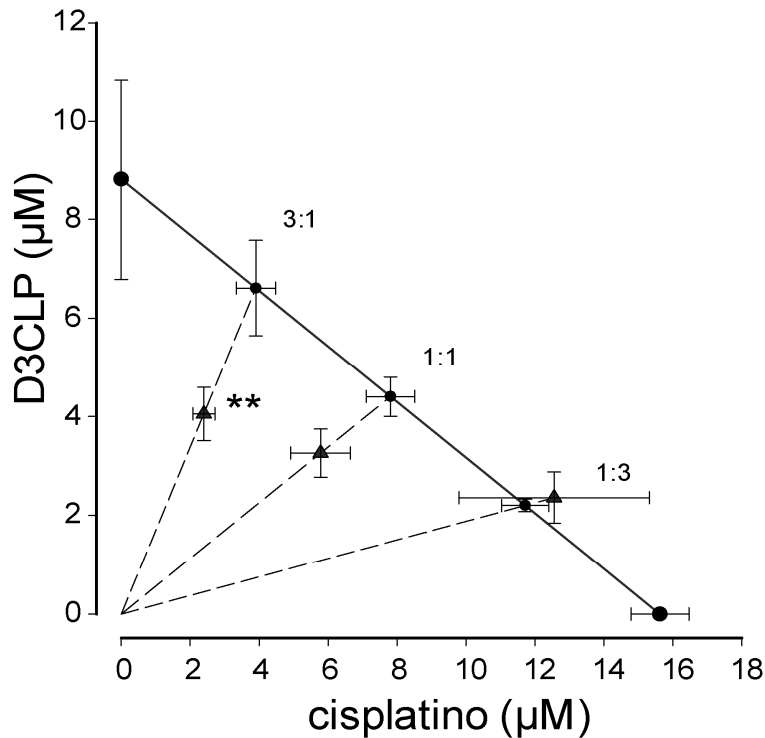


Figura 10. Isobolograma para la combinación de D3CLP con cisplatino en células HeLa. El tratamiento de ésta línea celular de cáncer cérvico-uterino con los fármacos en proporción 3:1 y 1:1 presentaron sinergismo. ** $p < 0.05$.

Del mismo modo que se han observado diversos tipos de efectos al combinar dos fármacos mediante el CI, empleando el análisis isobolográfico también se ha documentado este fenómeno. Por ejemplo, Sunami y colaboradores en 1999 evaluaron el efecto combinado del inhibidor de topoisomerasa I y II TAS-103 con diversos antineoplásicos como cisplatino, vindesina, doxorubicina y 5-fluorouracilo en células de cáncer de pulmón SBC-3. Los resultados muestran que la combinación de TAS-103 con cisplatino tiene un efecto sinérgico, mientras que la combinación de TAS-103 con los otros fármacos tienen un efecto aditivo o cercano al antagónico (*Sunami et al., 1999*).

Los resultados de índice de combinación y de análisis isobolográfico correlacionan para casi todas combinaciones a las proporciones evaluadas, excepto para las células K-562 tratadas con D3CLP más imatinib en proporción



1:3 y en células MCF-7 tratadas con D3CLP más tamoxifeno en la misma proporción, en las que por índice de combinación se presenta un efecto antagónico y mediante isoblograma presentaron efecto aditivo. A partir de los datos presentados podemos decir que ambos métodos nos proporcionan resultados similares y que ambos métodos son adecuados para la evaluación del efecto al combinar pares de fármacos.

De la Figura 8 y 10, se sugiere que hay un mayor sinergismo cuando aumenta la proporción de D3CLP, respecto a imatinib o cisplatino en la combinación. Los resultados de las combinaciones de fármacos indican que el tipo de efecto experimental depende de diversos factores, como: la naturaleza de cada fármaco, la proporción usada de cada uno de ellos o el tipo de línea celular empleada en el análisis. Así también se ha documentado que el tipo de efecto experimental al combinar fármacos depende de si los fármacos se administran de modo simultáneo o secuencial (*Giannakakou et al., 1998*).

Adicionalmente, la evaluación del efecto en combinaciones de fármacos *in vitro* es de gran importancia, no obstante se presente un efecto sinérgico, aditivo o antagónico. En caso de que D3CLP presentara una baja toxicidad en ensayos preclínicos, un efecto sinérgico como el presentado por la combinación de D3CLP mas cisplatino en una proporción 3:1 en células HeLa, podría representar un beneficio al disminuir las dosis que deben administrarse de cisplatino en pacientes con cáncer, con la consecuente disminución de ototoxicidad, neuropatía periférica, nefrotoxicidad y mielosupresión debidas al tratamiento con cisplatino. La combinación de D3CLP con imatinib podría disminuir enormemente el costo del tratamiento de la leucemia mieloide crónica, ya que como se observa en los resultados el efecto citotóxico se puede potenciar cuando aumenta la proporción de D3CLP en la combinación. Por otro lado, el documentar un efecto antagónico, como el observado para la combinación de D3CLP con tamoxifeno en células MCF-7 es relevante, ya que dicha combinación no podría representar ningún

beneficio y no debería administrarse esa combinación para el tratamiento del cáncer de mama positivo al receptor a estrógenos.

7.5 Determinación de la fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con D3CLP, cisplatino y su combinación en proporción 3:1

Se ha demostrado que en el tratamiento de células K-562 con D3CLP produce muerte celular con fragmentación de ADN sugerente de apoptosis (*González-Sánchez et al., 2011*). Para evaluar si D3CLP y su combinación con cisplatino en proporción 3:1 induce un proceso de muerte similar en células HeLa se evaluó la fragmentación de ADN, para lo cual se trataron las células anteriores con D3CLP, cisplatino, su combinación y vehículo (como control negativo) a diversos tiempos. Los resultados representativos de tres experimentos se muestran en la Figura 11. El tratamiento con el vehículo no induce fragmentación del ADN celular a ninguno de los tiempos evaluados. El tratamiento de células HeLa con D3CLP induce fragmentación del ADN evidente por el marcaje positivo al ensayo de TUNEL desde las 24 h de tratamiento, dicho tratamiento presentó tanto condensación de cromatina (flechas blancas) como fragmentación del núcleo celular (puntas de flecha).

Es ampliamente aceptado que el cisplatino ejerce su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes (aductos) con el ADN. El átomo de platino de éste fármaco se puede coordinar con el nitrógeno 7 de la guanina, lo que interfiere con las enzimas que procesan al ADN (*Holland, 2000*). Adicionalmente, el átomo de platino se puede coordinar con compuestos que contengan átomos de nitrógeno, el platino presenta una mayor afinidad por compuestos con átomos que contengan azufre presentes en las proteínas, particularmente presenta mayor afinidad por grupos tiol (*Petrovic et al., 2007*). Para el caso del tratamiento de células HeLa con cisplatino se observó un patrón de fragmentación de ADN similar al inducido por D3CLP, estos resultados están de acuerdo con reportes previos en los que se ha demostrado que cisplatino induce muerte celular de tipo apoptótico, así como la presencia de células positivas al marcaje de TUNEL



(Horky et al., 2001; Liu et al., 2008). El tratamiento de células HeLa con D3CLP más cisplatino en una proporción 3:1 presentó células positivas al marcaje de TUNEL, del mismo modo que D3CLP solo.

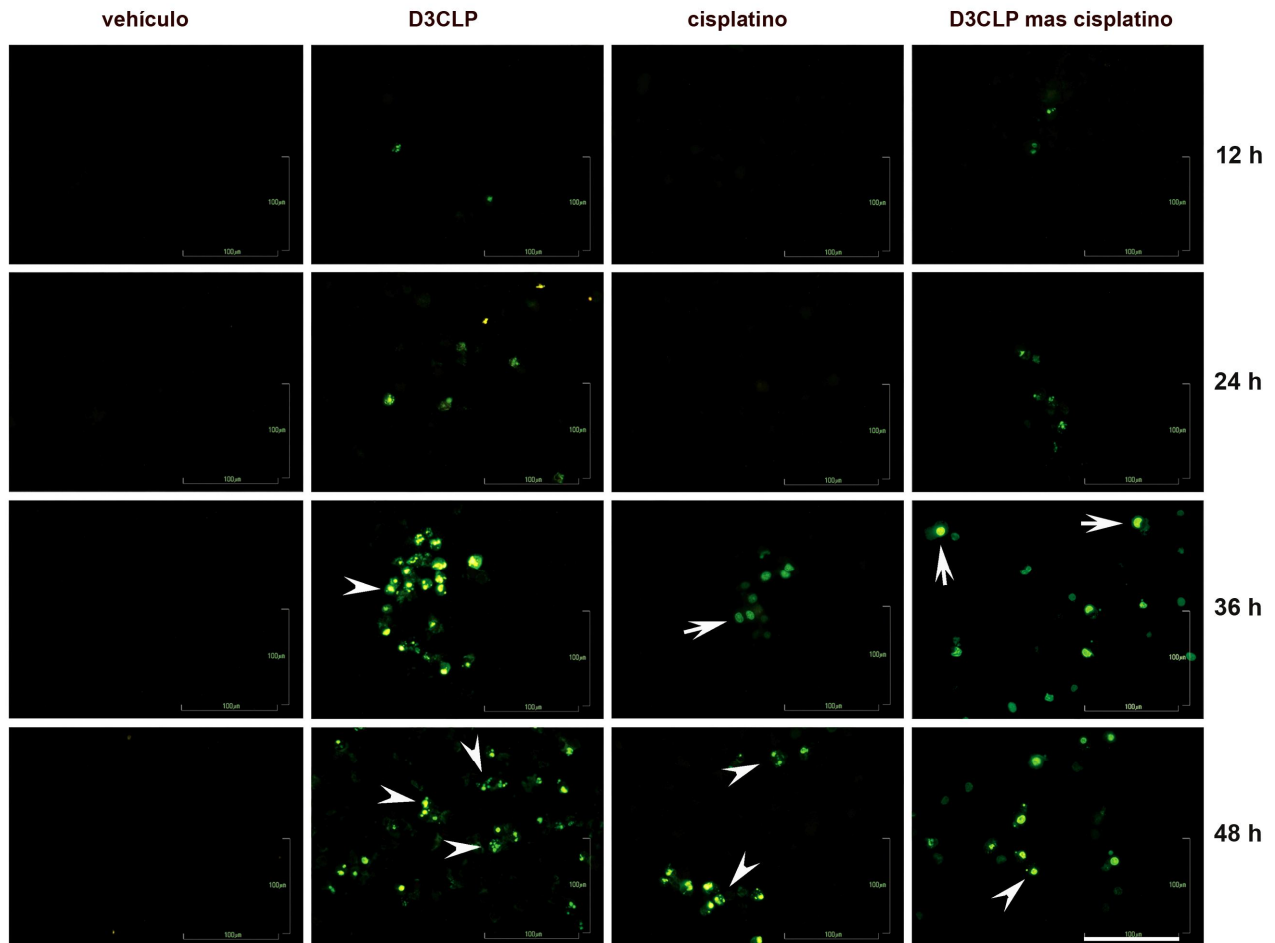


Figura 11. Determinación de la fragmentación de ADN en células HeLa tratadas con D3CLP, cisplatino y su combinación en proporción 3:1, mediante TUNEL a diferentes tiempos. El tratamiento con los fármacos produjo características sugerentes de apoptosis, como cromatina condensada (flechas) y fragmentación del núcleo (cabezas de flecha). Escala = 100 μ m.

Estos resultados sugieren que D3CLP y su combinación con cisplatino inducen apoptosis, ya que al tratar células HeLa con dichos fármacos en combinación el mecanismo de muerte es similar a los tratamientos con un solo fármaco (Figura



11). Adicionalmente, estos resultados son congruentes con lo observado en células K-562 tratadas con D3CLP a los mismos tiempos (*González-Sánchez et al., 2011*).

Aunque D3CLP probablemente induce muerte por apoptosis, al igual que cisplatino en células HeLa, la inducción de células positivas al marcaje por TUNEL por este derivado de tiazolo[5,4-*b*]quinolina fue desde las 12 h, mientras que cisplatino induce células positivas al TUNEL a partir de las 36 h lo cual sugiere que el mecanismo por el cual D3CLP induce muerte celular es diferente del inducido por cisplatino. Estos resultados apoyan el uso de la *ecuación 2* del índice de combinación, donde se considera que los dos fármacos tienen mecanismos de acción citotóxica diferentes.

8. CONCLUSIONES

Los resultados presentan un efecto sinérgico mediante índice de combinación y análisis isobolográfico cuando se combina D3CLP con otros agentes antineoplásicos, como se observó en células HeLa tratadas con la combinación de D3CLP más cisplatino y dicho sinergismo es mayor cuando la proporción de D3CLP aumenta en la combinación.

El tratamiento de células HeLa con D3CLP sólo o en combinación con cisplatino probablemente inducen muerte celular de tipo apoptótico. Lo cual confirma y extiende resultados previos.

Los resultados en general, demuestran que D3CLP sólo o en combinación, es un buen candidato para el uso en ensayos preclínicos y podría ser un tratamiento eficaz contra diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer cérvico-uterino.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar la toxicidad aguda y crónica de D3CLP en modelos animales.
- Caracterizar la toxicidad de D3CLP en diversos órganos después de su administración en ratones.
- Estudiar la efectividad antitumoral de D3CLP solo y en combinación en modelos de xenotransplantes.



10. REFERENCIAS

- Alison M. (2002). *The cancer handbook*. London, Nature.
- Alvarez-Ibarra C., Fernández-Granda R., Quiroga M.L., Carbonell A., Cárdenas F., Giralt E., (1997). Synthesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *J Med Chem* **40**(5): 668-676.
- Arlin Z., Mehta R., Feldman E., Sullivan P., Pucillo A., (1987). Amsacrine treatment of patients with supraventricular arrhythmias and acute leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* **19**(2): 163-164.
- Arlin Z.A., Feldman E.J., Mittelman A., Ahmed T., Puccio C., Chun H.G., Cook P., Baskind P., Marboe C., Mehta R., (1991). Amsacrine is safe and effective therapy for patients with myocardial dysfunction and acute leukemia. *Cancer* **68**(6): 1198-1200.
- Avendaño C., Menéndez J.C. (2008). *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Amsterdam Paris, Elsevier.
- Baquiran D.C. (2001). *Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Barouch-Bentov R., Sauer K., (2011). Mechanisms of drug resistance in kinases. *Expert Opin Investig Drugs* **20**(2): 153-208.
- Bast R.C. (2000). *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton, Ont. ; London, B. C. Decker.
- Berenbaum M.C., (1989). What is synergy? *Pharmacol Rev* **41**(2): 93-141.
- Bixby D., Talpaz M., (2009). Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 461-476.
- Buchholz S., Schally A.V., Engel J.B., Hohla F., Heinrich E., Koester F., Varga J.L., Halmos G., (2007). Potentiation of mammary cancer inhibition by combination of antagonists of growth hormone-releasing hormone with docetaxel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1943-1946.



-
- Carmichael J., Mitchell J.B., DeGraff W.G., Gamson J., Gazdar A.F., Johnson B.E., Glatstein E., Minna J.D., (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer* **57**(6): 540-547.
 - Casares C., Ramirez-Camacho R., Trinidad A., Roldan A., Jorge E., Garcia-Berrocal J.R., (2012). Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **269**(12): 2455-2459.
 - Cazzaniga M., Bonanni B., (2012). Breast cancer chemoprevention: old and new approaches. *J Biomed Biotechnol* **2012**: 985620.
 - Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Perez J.M., (2007). Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* **7**(1): 3-18.
 - Chilin A., Marzaro G., Marzano C., Dalla Via L., Ferlin M.G., Pastorini G., Guiotto A., (2009). Synthesis and antitumor activity of novel amsacrine analogs: the critical role of the acridine moiety in determining their biological activity. *Bioorg Med Chem* **17**(2): 523-529.
 - Chou T.C., Talalay P., (1983). Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharm Sci* **4**: 450-454.
 - Chou T.C., Talalay P., (1981). Generalized equations for the analysis of inhibitions of Michaelis-Menten and higher-order kinetic systems with two or more mutually exclusive and nonexclusive inhibitors. *Eur J Biochem* **115**(1): 207-216.
 - Chou T.C., Talalay P., (1984). Quantitative analysis of dose effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* **22**: 27-55.
 - Chou T.C., Talalay P., (1977). A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem* **252**(18): 6438-6442.
 - Chu E., DeVita V.T. (2007). *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual 2008*, Jones & Bartlett Learning, LLC.



-
- Daugaard G., Abildgaard U., (1989). Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* **25**(1): 1-9.
 - de Brito Galvao J.F., Kisseberth W.C., Murahari S., Sutayatram S., Chew D.J., Inpanbutr N., (2012). Effects of gemcitabine and gemcitabine in combination with carboplatin on five canine transitional cell carcinoma cell lines. *Am J Vet Res* **73**(8): 1262-1272.
 - DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (2001). *Cancer, principles and practice of oncology* Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
 - Eiring A.M., Khorashad J.S., Morley K., Deininger M.W., (2011). Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. *BMC Med* **9**: 99.
 - Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Forman D., Mathers C., Parkin D.M. (2010). "GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC." CancerBase No. 10. Consultado el 04/02/2012, en <http://globocan.iarc.fr>.
 - Ferlin M.G., Gatto B., Chiarelto G., Palumbo M., (2001). Novel pyrrolo[3,2-f]quinolines: synthesis and antiproliferative activity. *Bioorg Med Chem* **9**(7): 1843-1848.
 - Fornander T., Rutqvist L.E., Cedermark B., Glas U., Mattsson A., Silfversward C., Skoog L., Somell A., Theve T., Wilking N., et al., (1989). Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* **1**(8630): 117-120.
 - Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M., (2003). Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* **103**(3): 645-662.
 - García-López P., Rodríguez-Dorantes M., Perez-Cardenas E., Cerbon M., Mohar-Betancourt A., (2004). Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**(6): 533-540.
 - Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A., (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**(3): 493-501.



-
- Giannakakou P., Villalba L., Li H., Poruchynsky M., Fojo T., (1998). Combinations of paclitaxel and vinblastine and their effects on tubulin polymerization and cellular cytotoxicity: characterization of a synergistic schedule. *Int J Cancer* **75**(1): 57-63.
 - González-Sánchez I., Solano J.D., Loza-Mejía M.A., Olvera-Vazquez S., Rodríguez-Sotres R., Morán J., Lira-Rocha A., Cerbón M.A., (2011). Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem* **46**(6): 2102-2108.
 - Gottesman M.M., (1993). How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* **53**(4): 747-754.
 - Han B., Fujimoto N., Kobayashi M., Matsumoto T., (2012). Synergistic Effect of Geranylgeranyltransferase Inhibitor, GGTI, and Docetaxel on the Growth of Prostate Cancer Cells. *Prostate Cancer* **2012**: 989214.
 - Hanahan D., Weinberg R.A., (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
 - Heath C.W., Jr., Moloney W.C., (1965). The Philadelphia chromosome in an unusual case of myeloproliferative disease. *Blood* **26**(4): 471-478.
 - Holland J.F. (2000). *Cancer medicine*. Hamilton, Ontario ; New York, B.C. Decker.
 - Horky M., Wurzer G., Kotala V., Anton M., Vojtesek B., Vacha J., Wesierska-Gadek J., (2001). Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci* **114**(Pt 4): 663-670.
 - Ickenstein L.M., Bandiera S.M., (2002). Persistent suppression of hepatic CYP2A1 expression and serum triiodothyronine levels by tamoxifen in intact female rats: dose-response analysis and comparison with 4-hydroxytamoxifen, fulvestrant (ICI 182,780), and 17beta-estradiol-3-benzoate. *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 584-593.
 - INEGI. (2013). "Día mundial contra el cáncer." *Estadísticas a propósito del*
 Consultado el 06-02-2013, en



<http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2013/cancer0.doc>.

- Janss A.J., Cnaan A., Zhao H., Shpilsky A., Levow C., Sutton L., Phillips P.C., (1998). Synergistic cytotoxicity of topoisomerase I inhibitors with alkylating agents and etoposide in human brain tumor cell lines. *Anticancer Drugs* **9**(7): 641-652.
- Juliano R.L., Ling V., (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**(1): 152-162.
- Jurado R., López-Flores A., Alvarez A., García-López P., (2009). Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An *in vitro* and *in vivo* study. *Oncol Rep* **22**(5): 1237-1245.
- Kaufmann S.H., Mesner Jr P.W., Samejima K., Toné S., Earnshaw W.C. (2000). [1] Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods in Enzymology: Apoptosis*. J. C. Reed. San Diego ; London, Academic Press. **Volume 322**: 3-15.
- Kawai Y., Taniuchi S., Okahara S., Nakamura M., Gemba M., (2005). Relationship between cisplatin or nedaplatin-induced nephrotoxicity and renal accumulation. *Biol Pharm Bull* **28**(8): 1385-1388.
- Kim T.E., Park S.-Y., Hsu C.-H., Dutschman G.E., Cheng Y.-C., (2004). Synergistic Antitumor Activity of Troxacitabine and Camptothecin in Selected Human Cancer Cell Lines. *Mol Pharmacol* **66**(2): 285-292.
- Kosior K., Lewandowska-Grygiel M., Giannopoulos K., (2011). Tyrosine kinase inhibitors in hematological malignancies. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **65**: 819-828.
- Kumi-Diaka J., Rodriguez R., Goudaze G., (1998). Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. *Biol Cell* **90**(4): 349-354.
- Kurzrock R., Kantarjian H.M., Druker B.J., Talpaz M., (2003). Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* **138**(10): 819-830.



-
- Kusumoto S., Sugiyama T., Ando K., Hosaka T., Ishida H., Shirai T., Yamaoka T., Okuda K., Hirose T., Ohnishi T., Inoue F., Kanome T., Kadofuku T., Saijo N., Adachii M., Ohmori T., (2009). Combination effect between bortezomib and tumor necrosis factor alpha on gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Res* **29**(6): 2315-2322.
 - Lawrence N.J., Rennison D., McGown A.T., Ducki S., Gul L.A., Hadfield J.A., Khan N., (2001). Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J Comb Chem* **3**(5): 421-426.
 - Liu Y., Xing H., Han X., Shi X., Liang F., Cheng G., Lu Y., Ma D., (2008). Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **28**(2): 197-199.
 - Loza-Mejía M.A., Maldonado-Hernández K., Rodríguez-Hernandez F., Rodríguez-Sotres R., González-Sánchez I., Quintero A., Solano J.D., Lira-Rocha A., (2008). Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem* **16**(3): 1142-1149.
 - Loza-Mejía M.A., Olvera-Vázquez S., Maldonado-Hernández K., Guadarrama-Salgado T., González-Sánchez I., Rodríguez-Hernández F., Solano J.D., Rodríguez-Sotres R., Lira-Rocha A., (2009). Synthesis, cytotoxic activity, DNA topoisomerase-II inhibition, molecular modeling and structure activity relationship of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem* **17**(9): 3266-3277.
 - MacGregor J.I., Jordan V.C., (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* **50**(2): 151-196.
 - Marzano C., Bettio F., Baccichetti F., Trevisan A., Giovagnini L., Fregona D., (2004). Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chem Biol Interact* **148**(1-2): 37-48.
 - McWhinney S.R., Goldberg R.M., McLeod H.L., (2009). Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* **8**(1): 10-16.
 - Mizutani Y., Yoshida O., Miki T., Bonavida B., (1999). Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* **5**(9): 2605-2612.



-
- Morisaki T., Umebayashi M., Kiyota A., Koya N., Tanaka H., Onishi H., Katano M., (2013). Combining celecoxib with sorafenib synergistically inhibits hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* **33**(4): 1387-1395.
 - NCI. (2013). "What Is Cancer?" Consultado el 10-03-2013, en <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.
 - Nelson E.M., Tewey K.M., Liu L.F., (1984). Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-*m*-anisidide. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**(5): 1361-1365.
 - Nooter K., Herweijer H., (1991). Multidrug resistance (mdr) genes in human cancer. *Br J Cancer* **63**(5): 663-669.
 - OMS. (2013). "Nota descriptiva N°297. Cáncer." Consultado el 06-02-2013, en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
 - Palmieri C., Cheng G.J., Saji S., Zelada-Hedman M., Warri A., Weihua Z., Van Noorden S., Wahlstrom T., Coombes R.C., Warner M., Gustafsson J.A., (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **9**(1): 1-13.
 - Petrovic D., Stojimirovic B., Petrovic B., Bugarcic Z.M., Bugarcic Z.D., (2007). Studies of interactions between platinum(II) complexes and some biologically relevant molecules. *Bioorg Med Chem* **15**(12): 4203-4211.
 - Rabik C.A., Dolan M.E., (2007). Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* **33**(1): 9-23.
 - Rathos M.J., Joshi K., Khanwalkar H., Manohar S.M., Joshi K.S., (2012). Molecular evidence for increased antitumor activity of gemcitabine in combination with a cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 in pancreatic cancers. *J Transl Med* **10**: 161.
 - Robertson D.W., Katzenellenbogen J.A., Long D.J., Rorke E.A., Katzenellenbogen B.S., (1982). Tamoxifen antiestrogens. A comparison of the activity, pharmacokinetics, and metabolic activation of the cis and trans isomers of tamoxifen. *J Steroid Biochem* **16**(1): 1-13.



-
- Rodríguez-Loaiza P., Quintero A., Rodríguez-Sotres R., Solano J.D., Lira-Rocha A., (2004). Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. *Eur J Med Chem* **39**(1): 5-10.
 - Schindler T., Bornmann W., Pellicena P., Miller W.T., Clarkson B., Kuriyan J., (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**(5486): 1938-1942.
 - Sheikh-Hamad D., Timmins K., Jalali Z., (1997). Cisplatin-induced renal toxicity: possible reversal by N-acetylcysteine treatment. *J Am Soc Nephrol* **8**(10): 1640-1644.
 - Skeel R.T. (2007). *Handbook of cancer chemotherapy*. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
 - Smith L.L., Brown K., Carthew P., Lim C.K., Martin E.A., Styles J., White I.N., (2000). Chemoprevention of breast cancer by tamoxifen: risks and opportunities. *Crit Rev Toxicol* **30**(5): 571-594.
 - Sunami T., Nishio K., Kanzawa F., Fukuoka K., Kudoh S., Yoshikawa J., Saijo N., (1999). Combination effects of TAS-103, a novel dual topoisomerase I and II inhibitor, with other anticancer agents on human small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **43**(5): 394-401.
 - Tallarida R.J., (2001). Drug synergism: Its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(3): 865-872.
 - Tallarida R.J., (2006). An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(1): 1-7.
 - Tonra J.R., Deevi D.S., Corcoran E., Li H., Wang S., Carrick F.E., Hicklin D.J., (2006). Synergistic antitumor effects of combined epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 targeted therapy. *Clin Cancer Res* **12**(7 Pt 1): 2197-2207.
 - Tyagi A.K., Agarwal C., Chan D.C., Agarwal R., (2004). Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep* **11**(2): 493-499.



-
- Ugalde M., Reza V., Gonzalez-Trujano M.E., Avula B., Khan I.A., Navarrete A., (2005). Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and Valeriana edulis hydroalcoholic extract in mice. *J Pharm Pharmacol* **57**(5): 631-639.
 - van Moorsel C.J., Pinedo H.M., Veerman G., Bergman A.M., Kuiper C.M., Vermorken J.B., van der Vijgh W.J., Peters G.J., (1999). Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* **80**(7): 981-990.
 - Yunos N.M., Beale P., Yu J.Q., Huq F., (2011). Synergism from the combination of oxaliplatin with selected phytochemicals in human ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res* **31**(12): 4283-4289.
 - Zhao L., Wientjes M.G., Au J.L., (2004). Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses. *Clin Cancer Res* **10**(23): 7994-8004.



11. ANEXO

El presente proyecto doctoral dio origen a la siguiente publicación.

González-Sánchez I., Lira-Rocha A., Navarrete A., Loza-Mejía M.A., Coronel-Cruz C., Mendoza-Rodríguez C.A., Cerbón M.A., (2012). Synergistic Anticancer Activity of Thiazolo[5,4-b]quinoline Derivative D3CLP in Combination with Cisplatin in Human Cervical Cancer Cells. *Anticancer Res* **32**(12): 5159-5165.



Synergistic Anticancer Activity of Thiazolo[5,4-*b*]quinoline Derivative D3CLP in Combination with Cisplatin in Human Cervical Cancer Cells

IGNACIO GONZÁLEZ-SÁNCHEZ¹, ALFONSO LIRA-ROCHA², ANDRÉS NAVARRETE², MARCO A. LOZA-MEJÍA², CRISTINA CORONEL-CRUZ³, C. ADRIANA MENDOZA-RODRÍGUEZ¹ and MARCO A. CERBÓN¹

Departaments of ¹Biology and ²Pharmacy, Faculty of Chemistry, and

³Experimental Medicine, Faculty of Medicine. National Autonomous University of Mexico, Mexico, D.F., Mexico

Abstract. Background: D3CLP (9-[(3-chloro)phenylamine]-2-[3-(diethylamine)propylamine]thiazolo[5,4-*b*]quinoline) is a potent cytotoxic thiazolo[5,4-*b*]quinoline synthetic derivative that induces apoptosis of leukemia cells, while it displays low toxicity towards non-tumoral cells. The aim of this study was to determine if D3CLP can enhance the cytotoxicity of other antineoplastic drugs. Materials and Methods: Leukemia, breast and cervical cancer cell lines were exposed to D3CLP-alone or in combination with imatinib, tamoxifen or cisplatin, respectively. Cell viability after treatment was evaluated by the MTT assay, and cell death by the TUNEL assay. The effects of combined treatments were analyzed by combination index and isobolographic analysis. Results: Antiproliferative activity results indicate that D3CLP in combination with antineoplastic drugs induced a synergistic effect, at 3:1 and 1:1 ratios for D3CLP plus imatinib in K-562 leukemia cells, and at a 3:1 ratio for D3CLP with cisplatin in HeLa cells, as determined by their combination index. Furthermore, isobolographic analysis demonstrated a significant synergism for a 3:1 combination ratio of D3CLP with cisplatin in HeLa cells. In addition, TUNEL assay suggests cell death by apoptosis of HeLa cells after treatment with D3CLP and its combination with cisplatin at a 3:1 ratio. Conclusion: Overall the results indicate that D3CLP, in combined preparation with antineoplastic drugs, is a good candidate for pre-clinical studies in the treatment of different carcinoma cell types.

Correspondence to: M.A. Cerbón, Department of Biology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico D.F., 04510, Mexico. Tel: +52 5556223820, Fax: +52 5556162010, e-mail: mcerbon85@yahoo.com.mx

Key Words: Thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivative D3CLP, antitumor combinations analysis, chemotherapeutic agents, synergism, cancer.

Cancer is a major cause of human death worldwide. In 2008, it caused 7.6 million deaths, which represent around 13% of total deaths globally (1). Out of these deaths, 70% occurred in countries with low or middle income. Thus, an increase in the incidence of different types of cancer, such as breast cancer, leukemia, and the high frequency of cervical cancer constitute a growing public health problem.

These types of cancers, are often detected in advanced stages, with a low survival rate in Latin America (2). One of the treatments for advanced cancer stages is chemotherapy. Therefore, the evaluation of new antineoplastic drugs is of great importance in cancer chemotherapy. Anticancer drugs are diverse, and are obtained from both synthetic and natural sources.

It has been demonstrated in several cancer cell lines, that thiazolo[5,4-*b*]quinolines derivatives are cytotoxic compounds. They are structurally related to m-amsacrine (m-Amsa) (3), which is a DNA intercalator and inhibitor of human topoisomerase II *in vitro* (4-6). 9-[(3-chloro)phenylamine]-2-[3-(diethylamine) propylamine] thiazolo[5,4-*b*]quinoline (D3CLP) is a thiazolo[5,4-*b*]quinoline synthetic derivative (Figure 1), which possesses high cytotoxic activity towards several human tumor cell lines (5). Recently, it has been shown that this compound induces significant cell death of leukemia K-562 cells. Treatment of these cells with D3CLP induces apoptosis by activation of effector caspases, without cell-cycle alteration. In addition, D3CLP displays low toxicity towards non-tumoral cells (7).

The use of chemotherapeutic drugs is dose-limiting due to its overall cytotoxicity. The toxicity produced by these drugs towards different organs has led to use it in combination, to achieve better therapeutic outcomes. Combined chemotherapy uses two or more drugs with proven effects against a tumor type (8). Combined treatments with chemotherapeutic drugs may be synergistic, additive or antagonist. If some drugs have a synergistic effect, this provides treatment cost reductions, as well as fewer side

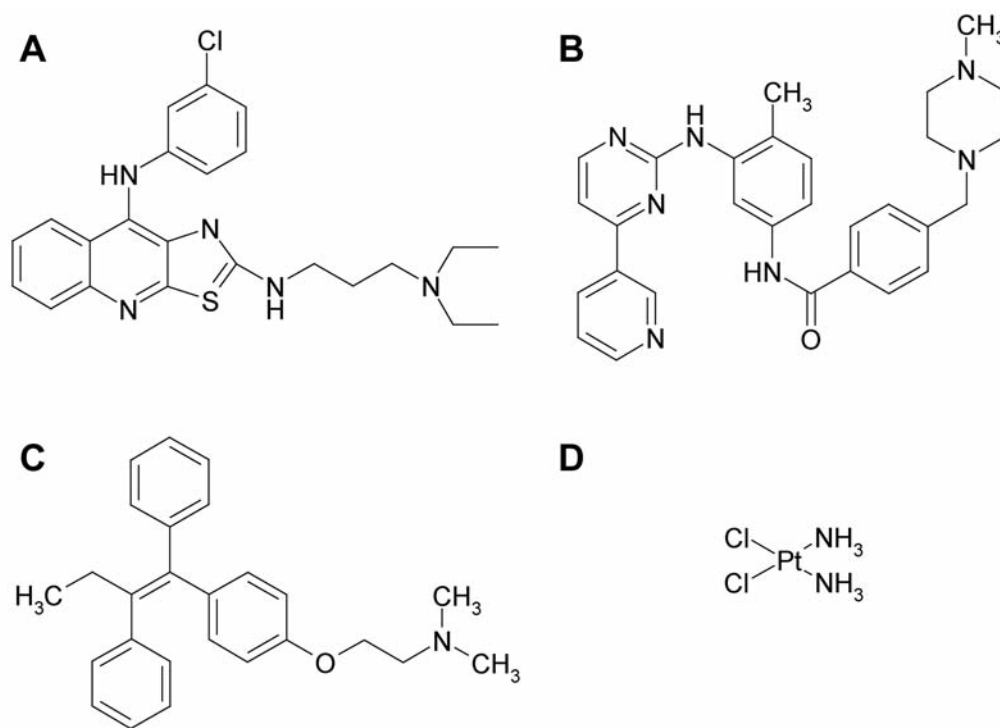


Figure 1. Chemical structures of cytotoxic compounds used in this study: D3CLP (A), imatinib (B), tamoxifen (C), and cisplatin (D).

effects. There are two methods widely used to analyze combined effects of drugs: the combination index (CI) (9), and the isobolographic analysis (10). The aim of this work was to evaluate if D3CLP has *in vitro* synergistic effects when combined with antineoplastic drugs currently in clinical use, such as imatinib, tamoxifen and cisplatin (Figure 1). Initially, we evaluated the effects on cell viability of single-agents, and then, the antiproliferative combined effect of D3CLP with the antineoplastic drugs were analyzed by the CI and isobolograms in three cell lines originating from neoplasms, which present high incidence in Mexico: leukemia, breast and cervical cancer.

Materials and Methods

Drugs. Antitumor drugs used were: Cisplatin (Lemery Laboratories, México, D.F., México), tamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), imatinib mesylate (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). D3CLP was prepared by Dr. Alfonso Lira-Rocha. Its structure, chemical synthesis and characterization have been previously reported (5). Cisplatin was used in isotonic solution, and all other compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA).

Cell culture. Different human cancer cells lines, leukemia (K-562), breast (MCF-7) and cervix (HeLa) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). HeLa and K-562 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's

medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin G, 100 U/ml streptomycin sulfate and 0.25 µg/ml amphotericin B (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Previously to drug exposure, only MCF-7 cells were suspended and plated in DMEM without phenol red, containing 10% charcoal-stripped FBS. The cultures were performed under standard conditions, as previously described (7).

Cytotoxicity analysis. Cell viability after treatments was assessed by a modified MTT assay (11, 12), in three independent experiments. K-562, MCF-7 and HeLa cells were seeded at 7×10^3 cells/well containing 200 µl of the corresponding medium in 96-well plates. After 24 h, the cells were treated with different concentrations of D3CLP, imatinib, tamoxifen, cisplatin or the vehicle, respectively, which were added to each well in a volume of 50 µl, to give a total volume of 250 µl of the indicated final concentration. Then 48 h later, 20 µl of 2.5 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS (pH 7.4) was added for cell viability quantification. After 2 h at 37°C, the supernatants were removed and 0.2 ml of DMSO was added to each well, followed by gentle shaking. Absorbance was measured at 540 nm using an Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, VT, USA). The amount of formazan detected is proportional to the number of living cells, and the corrected cell viability was determined using non-linear regression with OriginPRO® 7.0 software package (OriginLab, Northampton, MA, USA), as reported elsewhere (7). The drug concentrations that induced a cell viability of 50% (IC₅₀), as compared with the vehicle-treated cells, were the result of three independent experiments with six replicates each.

Table I. Cytotoxicity in independent drug treatments. Data represent the mean of three independent experiments \pm SEM.

Drug	Cell line	IC ₅₀ (μM)
D3CLP	K-562	8.55 \pm 1.29
	MCF-7	11.22 \pm 1.45
	HeLa	8.81 \pm 1.17
Imatinib	K-562	2.37 \pm 0.12
Tamoxifen	MCF-7	22.71 \pm 1.59
Cisplatin	HeLa	15.62 \pm 0.48

Combined cytotoxicity assay. From the IC₅₀ data for single-compound treatments, we evaluated new doses to determine the combined effect of D3CLP plus antineoplastic drugs currently used. For the combination at a 3:1 ratio, the drugs were used as follow: 0.75 \times IC_{50A} plus 0.25 \times IC_{50B}, where IC_{50A} was the IC₅₀ of D3CLP and IC_{50B} was the IC₅₀ for the other antineoplastic drug for the same cell line. Two additional higher doses and two lower doses in geometrical proportions were added to cells. Treatments in a similar manner were considered for the combinations at a 1:1 ratio (0.5 \times IC_{50A} plus 0.5 \times IC_{50B}) and 1:3 (0.25 \times IC_{50A} plus 0.75 \times IC_{50B}). In the combined treatments, the drugs were administered one after the other and the effect on the cell viability was evaluated by the MTT assay after 48 h, and analyzed using both the CI (13), and isobolographic method (14, 15) to determine cytotoxic synergism, additivity or antagonism. The IC₅₀ value of the drug combination was the result of three independent experiments with six replicates each.

The CI was determined as $CI_x = (D1/Dx1) + (D2/Dx2)$, where CI_x represents the CI value for 50% viability (50% effect), Dx1 and Dx2 represent the doses of agents 1 and 2 required to exert 50% effect alone, and D1 and D2 represent the doses of agents 1 and 2 that elicit the same 50% effect in combination with the other agent, respectively. For the CI analysis, we considered that the two drugs under evaluation had different mechanisms of inducing cell death. If the CI value is close to 1, the interaction is additive; values lower than 1 are an indication of synergistic interaction; and values higher than 1 correspond to antagonistic interaction (16).

For the isobolographic method, we constructed isobolograms for a given IC₅₀ level of effect, where equipotent doses of D3CLP and the studied antineoplastic drug are plotted on the x- and y-axes, respectively. The line that connects these doses corresponds to the additivity line and represent the theoretical IC₅₀ value for all possible combinations of these drugs. The experimental data point, obtained from the dose–response curve of the combination is subsequently represented. The site in the graph where the experimental data point is located determines the type of interaction. If the experimental point falls under the additivity line, and is statistically different from additivity, the effect of the combination is synergistic. If the point falls on the additivity line, there is no interaction between the drugs and the effects are simply additive. In contrast, if the point that represents the IC₅₀ for the combination is located above the additivity line, and is statistically different from additivity, therefore antagonism is present (10, 17).

DNA fragmentation detection assay. Drug-induced DNA fragmentation was evaluated by the TUNEL (In Situ Cell Death Detection kit, Fluorescein®; Roche GmbH Mannheim, Germany)

Table II. Combination index values for the combination of D3CLP with antineoplastic drugs of current clinical use at different ratios.

Cancer cell lines	D3CLP combination	3:1	1:1	1:3
K-562	Imatinib	0.69	0.86	1.20
MCF-7	Tamoxifen	1.20	1.26	1.22
HeLa	Cisplatin	0.85	1.04	1.06

If the combination index value is close to 1, the interaction is additive; values lower than 1 are an indication of synergistic interaction, and values higher than 1 correspond to antagonistic interaction (see Materials and Methods).

assay, according to the manufacturer's instructions. Petri dishes (60 mm) with glass coverslips were seeded with 5 \times 10⁵ HeLa cells and were allowed to adhere and grow on glass coverslips, in standard conditions for 24 h. The cells were then incubated with IC₅₀ of D3CLP (8.8 μM), or cisplatin (15.6 μM), or its combination in a 3:1 ratio according to the IC₅₀ value (6.6 μM D3CLP plus 3.9 μM cisplatin) for 12, 24 and 48 h. After incubation, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate and then rinsed twice with PBS. The DNA nick-labeling reaction was performed at 37°C for 60 min using 50 μl of TUNEL reaction mixture, which included 45 μl of labeled nucleotide mix and 5 μl of enzyme solution, according to the manufacturer's instructions. After incubation, the samples were rinsed with PBS three times and then placed on slides using DAKO Fluorescent Mounting Medium (Dako, Carpinteria, CA, USA), and analyzed by fluorescence microscopy.

Statistical analysis. Data are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments, with six replicates each. Statistically significant differences between two treatments were analyzed with the Student's *t*-test. A $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results

Single-agent effects on cell viability. As a first step, before assessing the combined effect of two drugs, it is necessary to determine their own cytotoxicity. Cytotoxicity of imatinib, tamoxifen and cisplatin were assessed in human leukemia, breast and cervical cancer cells, respectively. The results showed that the IC₅₀ value for the D3CLP, in these cell lines was approx. 10 μM (Table I). Treatment of these cell lines with antineoplastic drugs currently in clinical use demonstrated IC₅₀ values from 2 to 22 μM (Table I). The most sensitive cell line to the effect of D3CLP, was K-562 and the less sensitive one was MCF-7 (Table I).

Combined antiproliferative effect of D3CLP with chemotherapeutic drugs. The CI used in this study was determined from the cytotoxicity data according to what has been previously described (13), and the experiments

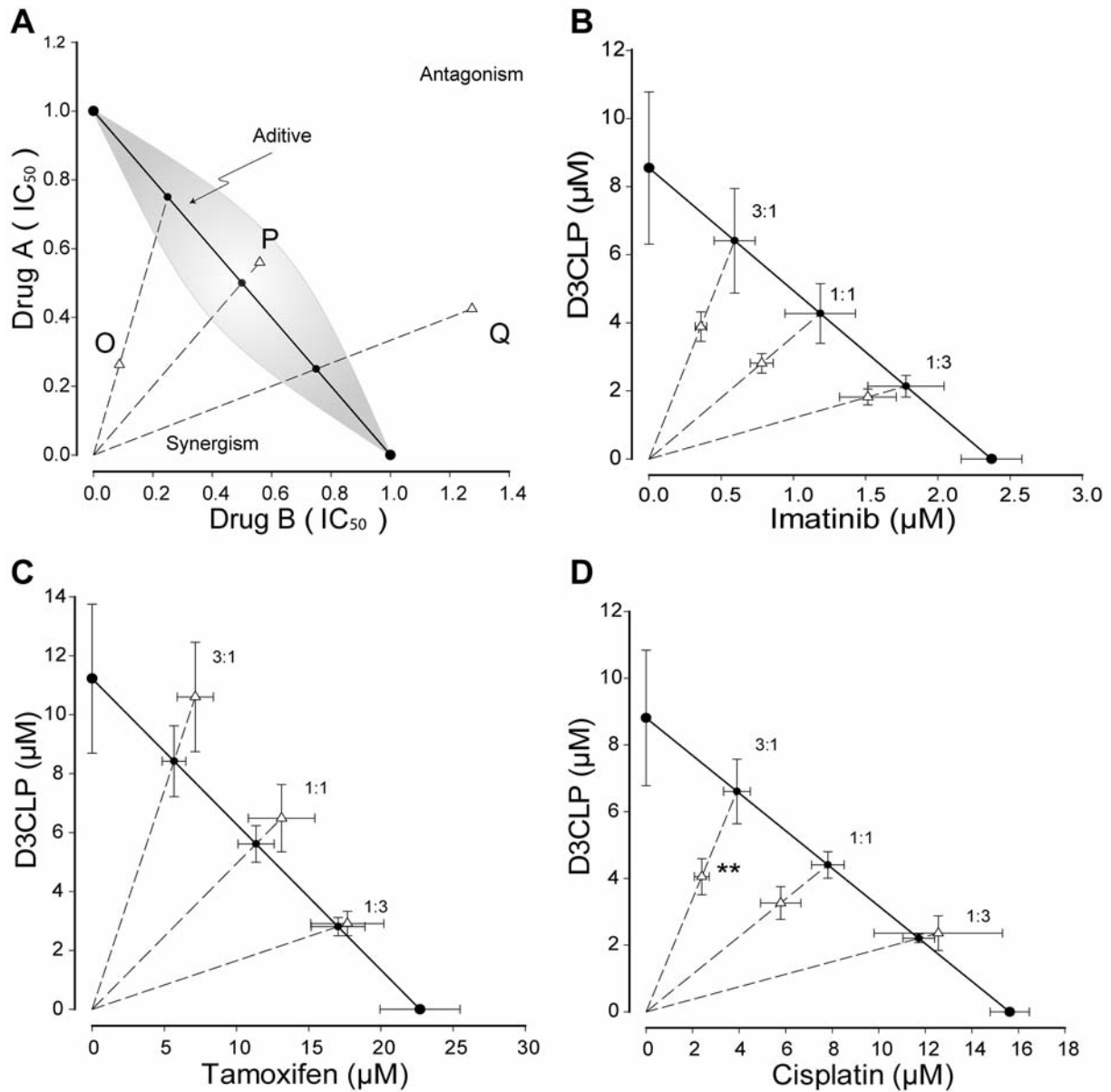


Figure 2. Isobolograms. Schematic representation of one isobologram; O, P and Q represent synergism, additivity and antagonism, respectively (A), Combined effect of D3CLP plus imatinib in K-562 cells (B), D3CLP plus tamoxifen in MCF-7 cells (C), and D3CLP plus cisplatin on HeLa cells (D). Data represent the mean±SEM. ***p*<0.05 as compared with the theoretical additive value.

were performed in several cell lines with different origin. Since D3CLP induces cell death in a diversity of cancer cell types, the most sensitive cells were further assessed as a model to determine the effect of combination treatment (data not shown). The combination of D3CLP with imatinib showed a synergistic antiproliferative effect for a 3:1 ratio, moderate synergism for a 1:1 ratio, and moderate antagonism for a 1:3 ratio, in K-562 cells (Table II). Treatment of MCF-7 breast cancer cells, which express estrogen receptors, with D3CLP plus tamoxifen induced an

antagonistic antiproliferative effect at all proportions evaluated. Finally, the antiproliferative effect of D3CLP combined with cisplatin produced a synergistic effect at a 3:1 ratio and an additive effect for the 1:1 and 1:3 ratios, in HeLa cells, by CI (Table II).

Isobolographic analysis of the combination of D3CLP plus imatinib in K-562 cells showed an effect below the additive line for all proportions evaluated (Figure 2B). However, since there was no statistical difference between the experimental and theoretical IC₅₀ for the combination of these drugs, this

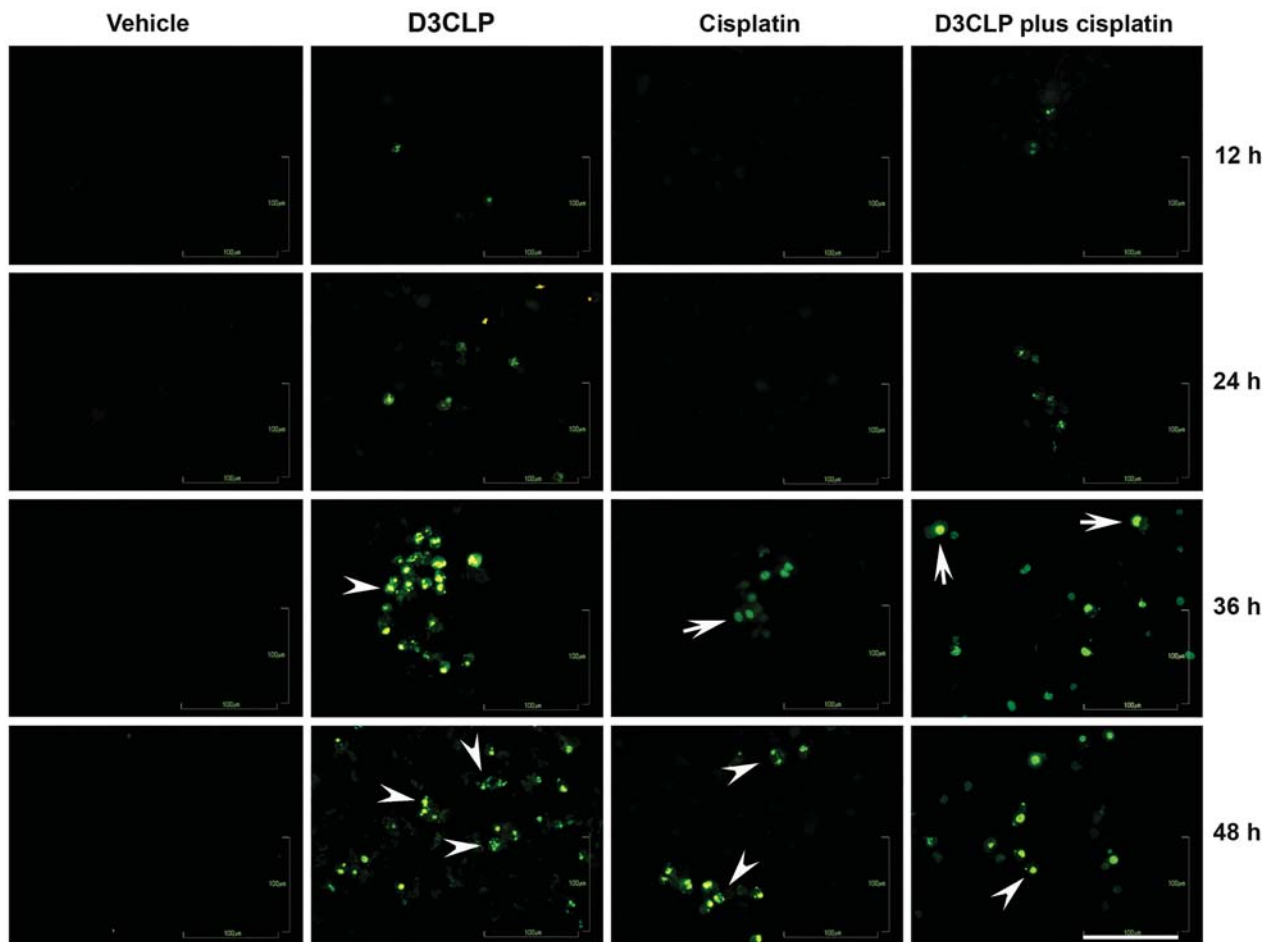


Figure 3. Drug-induced DNA fragmentation. The treatment of HeLa cells with D3CLP, cisplatin or their combination in a 3:1 ratio produced TUNEL-positive cells with chromatin condensation (arrows) and fragmented nuclei (arrowheads). Scale bar=100 μ m.

indicates that the observed effect for all of the tested proportions was an additive one. In the same manner, treatment of MCF-7 cells with D3CLP plus tamoxifen (Figure 2C) also demonstrated an additive effect. All the evaluated proportions of D3CLP with tamoxifen led to an effect above the additive line, but there was no statistical difference between the experimental and theoretical IC_{50} for each analyzed proportion to indicating an additive effect. In contrast, treatment of HeLa cells with D3CLP plus cisplatin at a 3:1 ratio, showed a significant effect below or in the additive line, indicating a synergistic effect; the effect of the other proportions were below the additive line, thus additive effects were observed (Figure 2D).

DNA fragmentation after drug exposure of HeLa cells. To explore the mechanism of cell death in HeLa cells after treatment with D3CLP or its synergistic combination with cisplatin, we assessed DNA fragmentation levels by the

TUNEL assay. D3CLP induced early DNA fragmentation in HeLa cells as shown by a significant number of TUNEL-positive cells at 12 h, which was even higher at 36 and 48 h (Figure 3). In contrast, cisplatin treatment induced TUNEL-positive HeLa cells, which were only evident 36 h after treatment. Concerning the combination of D3CLP and cisplatin at 3:1 ratio, positive cells were detected at 12 h, in a similar manner as in the treatment with D3CLP-alone, in the same cell line (Figure 3). In addition to the presence of TUNEL-positive cells, nuclear fragmentation was also observed, which has been widely associated with apoptotic cell death.

Discussion

It has been well-established that anticancer drugs such as imatinib, which is a specific inhibitor of the BCR/ABL fusion tyrosine kinase (18-21), is an agent specifically active against

leukemia, and was used in the present study against K-562 leukemia cells. On the other hand, the antiestrogen tamoxifen was used on MCF-7 mammary cancer cells, sensitive to antiestrogen therapy (22-24); and finally, we used the inducer of DNA intra-strand adducts, cisplatin which exerts important wide antineoplastic activity (25, 26), towards HeLa cells (27). In the present study, these drugs were used for combination assays with D3CLP. The results demonstrate that selected combinations exert substantive synergistic effects. Indeed, the combination analysis of D3CLP and these antineoplastic drugs indicate a synergistic effect, as demonstrated by CI for D3CLP plus imatinib on K-562 leukemia cells at 3:1 and 1:1 proportions, and for D3CLP with cisplatin at 3:1 ratio. In contrast, other tested combinations of D3CLP were from additive to sub-additive (antagonistic) (Table II). To further evaluate the anticancer drug activity of our combinations, we used an isobolographic approach, and the results confirmed a synergism for the combination of D3CLP plus imatinib at 3:1 ratio, which was in agreement with its CI for the same ratio. In spite of this effect not being statistically significant, these observations support the idea that these compounds may exert enhanced anticancer activity when combined at other ratios.

On the other hand, the combination of D3CLP with tamoxifen induced a sub-additive activity and, apparently, it was ineffective in various combinations used in this study, thus suggesting that the anti-hormonal activity of tamoxifen and D3CLP combination, may not be of potential clinical anticancer use.

Interestingly in our study, the treatment of HeLa cells with D3CLP plus cisplatin at 3:1 ratio exhibited a super-additive and statistically significant effect, indicating that this combination was synergistic. In addition, as has been shown, D3CLP is a compound that may induce cell death with an IC_{50} at the range of concentrations used as a chemotherapeutic agent, at micromolar doses (28). Furthermore, it displays low toxicity towards control non-tumoral cells (5, 7), thus indicating that this compound may be a good candidate for different combination of anticancer drug studies in animal models of cervical cancer.

Synergistic effects of D3CLP observed in this study are in line with previous reports that indicate that synergistic and additive effects may occur when imatinib (29-31), tamoxifen (32-34), and cisplatin (13, 35-36), are administered in combination with other drugs in different cell lines.

The results of the DNA fragmentation assays indicate that treatment of HeLa cells with D3CLP induces morphological and biochemical changes suggestive of apoptosis. After 12 h of treatment, we observed the appearance of TUNEL-positive cells and a marked increase of apoptotic cells at 36 h for the combined treatment, compared with the cisplatin treatment-alone. This result is in line with our previous report which demonstrated that D3CLP was capable of inducing significant apoptotic cell death in K-562 cells (7). Moreover, it has been

demonstrated that treatment of HeLa cells with cisplatin induced DNA fragmentation through active effector caspases, and apoptosis (37, 38). The observation that D3CLP and cisplatin differ in the time of cell death induction suggests a different target by which D3CLP induces cell death, and further validates the use of the equation for the mixture of mutually exclusive drugs in the CI, described by Chou and Talalay (9), as was the case for the combination of cisplatin and D3CLP. Additionally, for the combination of D3CLP with cisplatin at the 3:1 ratio, similar TUNEL staining and histomorphological characteristics have been reported for D3CLP in K-562 cells (7). Our data suggest that treatment of HeLa cells with D3CLP can induce apoptotic death and its combination with cisplatin enhances a similar type of cell death.

Conclusion

This study demonstrated the *in vitro* cytotoxic synergism of D3CLP and cisplatin towards HeLa cells at a 3:1 ratio, based on the IC_{50} , confirmed by both CI and isobolographic analysis. The overall results indicate that D3CLP in combined preparation is a good candidate for preclinical studies and could be useful in the treatment of different carcinomas, including cervical carcinoma.

Acknowledgements

This work was supported in part by project 234/2010 from the Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, México, D.F. México and DGAPA, PAPIIT PROGRAM IN218910. I. González-Sánchez received a fellowship of CONACYT (298713/226748).

References

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010): GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. International Agency for Research on Cancer. <http://globocan.iarc.fr>, last accessed 04/02/2012.
- 2 WHO (2012): Fact sheet N°297. Cancer. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>, last accessed 03/10/2012.
- 3 Alvarez-Ibarra C, Fernández-Granda R, Quiroga ML, Carbonell A, Cárdenas F and Giralt E: Synthesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives. *J Med Chem* 40: 668-676, 1997.
- 4 Loza-Mejía MA, Maldonado-Hernández K, Rodríguez-Hernández F, Rodríguez-Sotres R, González-Sánchez I, Quintero A, Solano JD and Lira-Rocha A: Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem* 16: 1142-1149, 2008.
- 5 Loza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Maldonado-Hernández K, Guadarrama-Salgado T, González-Sánchez I, Rodríguez-Hernández F, Solano JD, Rodríguez-Sotres R and Lira-Rocha A: Synthesis, cytotoxic activity, DNA topoisomerase-II inhibition, molecular modeling and structure activity relationship of 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem* 17: 3266-3277, 2009.

- 6 Nelson EM, Tewey KM and Liu LF: Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1361-1365, 1984.
- 7 González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía MA, Olvera-Vazquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A and Cerbón MA: Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem* 46: 2102-2108, 2011.
- 8 Baquiran DC: Lippincott's Cancer Chemotherapy Handbook. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- 9 Chou T-C and Talalay P: Analysis of combined drug effects: A new look at a very old problem. *Trends Pharm Sci* 4: 450-454, 1983.
- 10 Tallarida RJ: An overview of drug combination analysis with isobolograms. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1-7, 2006.
- 11 Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63, 1983.
- 12 Quintero A, Pelcastre A and Solano JD: Antitumoral activity of new pyrimidine derivatives of sesquiterpene lactones. *J Pharm Pharm Sci* 2: 108-112, 1999.
- 13 Garcia-Lopez P, Rodriguez-Dorantes M, Perez-Cardenas E, Cerbon M and Mohar-Betancourt A: Synergistic effects of ICI 182,780 on the cytotoxicity of cisplatin in cervical carcinoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 533-540, 2004.
- 14 Tallarida RJ: Statistical analysis of drug combinations for synergism. *Pain* 49: 93-97, 1992.
- 15 Tallarida RJ, Porreca F and Cowan A: Statistical analysis of drug drug and site site interactions with isobolograms. *Life Sci* 45: 947-961, 1989.
- 16 Chou TC and Talalay P: Quantitative analysis of dose effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55, 1984.
- 17 Tallarida RJ: Drug synergism: Its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 865-872, 2001.
- 18 Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J and Lydon NB: Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr/Abl-positive cells. *Nat Med* 2: 561-566, 1996.
- 19 Deininger MW, Goldman JM, Lydon N and Melo JV: The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR/ABL-positive cells. *Blood* 90: 3691-3698, 1997.
- 20 Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, Buchdunger E, Zimmermann J, Lydon NB, Gilliland DG and Druker BJ: CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR/ABL, TEL/ABL, and TEL/PDGFR fusion proteins. *Blood* 90: 4947-4952, 1997.
- 21 Olsson-Stromberg U, Aleskog A, Bjornberg A, Hoglund M, Simonsson B, Bengtsson M, Barbany G, Larsson R and Lindhagen E: Imatinib activity *in vitro* in tumor cells from patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase and blast crisis. *Anticancer Drugs* 17: 631-639, 2006.
- 22 Rostagno P, Caldani C and Lahlou B: Cell cycle expression of steroid receptors determined by image analysis on human breast cancer cell line: A hypothesis on the effects of antiestrogens. *Breast Cancer Res Treat* 37: 77-87, 1996.
- 23 Jordan VC: Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1): S269-276, 2006.
- 24 Rossi T, Iannuccelli V, Coppi G, Bruni E and Baggio G: Role of the pharmaceutical excipients in the tamoxifen activity on MCF-7 and vero cell cultures. *Anticancer Res* 29: 4529-4533, 2009.
- 25 Wherland S, Deutsch E, Eliason J and Sigler PB: Interactions between polynucleotides and platinum (II) complexes. *Biochem Biophys Res Commun* 54: 662-668, 1973.
- 26 Kelland L: The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7: 573-584, 2007.
- 27 Marzano C, Bettio F, Baccichetti F, Trevisan A, Giovagnini L and Fregona D: Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity. *Chem Biol Interact* 148: 37-48, 2004.
- 28 Boyd MR (2012): The NCI *In Vitro* Anticancer Drug Discovery Screen. National Cancer Institute. http://home.ncifcrf.gov/mtdp/catalog/full_text/paper309/Paper309.pdf, last accessed 10/02/2012
- 29 Bruce IA, Slevin NJ, Homer JJ, McGown AT and Ward TH: Synergistic effects of imatinib (STI 571) in combination with chemotherapeutic drugs in head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 16: 719-726, 2005.
- 30 Switalska M, Nasulewicz-Goldeman A, Opolska A, Maciejewska M, Kutner A and Wietrzyk J: The *in vitro* antiproliferative effect of PRI-2191 and imatinib applied in combined treatment with cisplatin, idarubicin, or docetaxel on human leukemia cells. *Anticancer Drugs* 23: 70-80, 2012.
- 31 Tipping AJ, Mahon FX, Zafirides G, Lagarde V, Goldman JM and Melo JV: Drug responses of imatinib mesylate-resistant cells: Synergism of imatinib with other chemotherapeutic drugs. *Leukemia* 16: 2349-2357, 2002.
- 32 Argiris A, Wang CX, Whalen SG and DiGiovanna MP: Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clin Cancer Res* 10: 1409-1420, 2004.
- 33 Mai Z, Blackburn GL and Zhou JR: Genistein sensitizes inhibitory effect of tamoxifen on the growth of estrogen receptor-positive and HER2-overexpressing human breast cancer cells. *Mol Carcinog* 46: 534-542, 2007.
- 34 Ropero S, Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Montero S, Cortés-Funes H and Colomer R: Trastuzumab plus tamoxifen: Antiproliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 86: 125-137, 2004.
- 35 Bae-Jump VL, Zhou C, Boggess JF and Gehrig PA: Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. *Cancer* 115: 3887-3896, 2009.
- 36 Jurado R, Lopez-Flores A, Alvarez A and Garcia-Lopez P: Cisplatin cytotoxicity is increased by mifepristone in cervical carcinoma: An *in vitro* and *in vivo* study. *Oncol Rep* 22: 1237-1245, 2009.
- 37 Horky M, Wurzer G, Kotala V, Anton M, Vojtesek B, Vacha J and Wesierska-Gadek J: Segregation of nucleolar components coincides with caspase-3 activation in cisplatin-treated HeLa cells. *J Cell Sci* 114: 663-670, 2001.
- 38 Liu Y, Xing H, Han X, Shi X, Liang F, Cheng G, Lu Y and Ma D: Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 28: 197-199, 2008.

Received September 3, 2012

Revised October 20, 2012

Accepted October 22, 2012