

157



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA DE NUEVOS COMPUESTOS RELACIONADOS CON LA EPOTILONA Y ARIL-FOSFATOS EN LINEAS CELULARES TUMORALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

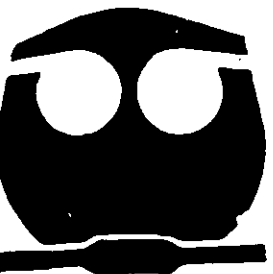
P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL VILCHIS REYES

296933



FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO, D. F.

2001



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.

Para mis padres Maria Isabel y Damian

Agradezco a la Dra. Angelina Quintero por su apoyo y asesoría, por corregir mis errores y responder mis preguntas, además por revisar el manuscrito que no siempre fue claro. Estoy especialmente agradecido por la buena voluntad mostrada por el Q.F.B. José Solano al brindarme su asesoría y sus sugerencias que siempre fueron completas y constructivas.

He sido auxiliado por la prof. Alicia Cervantes y por el Prof. Jesús F. Montiel en la revisión de este trabajo brindando sus sugerencias y corrigiendo errores por lo que les doy mi mas sincero agradecimiento. Gracias al Q. Marcos T. Martínez por su valiosa ayuda en la realización de las figuras que aparecen en el texto.

Deseo expresar mi reconocimiento a mis profesores que inculcaron en mi el agrado por la química, a mis compañeros que siempre hicieron agradable mi estancia en la Facultad y evitaron que cayera en pánico y paranoia, especialmente reconozco la labor de la Universidad Nacional Autónoma de México por su diversidad y apoyo flagrantes que han contribuido enormemente a que haya logrado alcanzar muchas de mis metas.

Finalmente a mi familia, por su apoyo y paciencia que ha llegado a límites extremos, mi agradecimiento simplemente no se puede expresar con palabras.

INDICE

Abreviaturas	1
I. Resumen	2
II. Objetivo	4
III. Hipótesis	4
IV. Introducción	5
4.1 Cáncer	5
4.2 Quimioterapia del cáncer	16
4.3 Descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos	36
V. Metodología	43
5.1 Mantenimiento de líneas celulares	43
5.2 Análisis de citotoxicidad	44
5.3 Soluciones	47
5.4 Líneas celulares	50
VI. Resultados	52
VII. Análisis de resultados	61
VIII Conclusiones	67
IX. Perspectivas	68
X. Bibliografía	69

ABREVIATURAS

$\Delta\psi$	Potencial de membrana mitocondrial
ATP	trifosfato de adenina
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
cGMP	monofosfato de guanina cíclico
CMA	Moléculas de adhesión
COX	Ciclooxigenasa
DD	Dominio de muerte
DED	dominios efectores de muerte
D-MEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HBV	Virus de la hepatitis B
HEPES	Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazin-N'-(2-etanosulfónico)
HPV	Virus del papiloma humano
LOH	Perdida de la heterozigosidad
MHC	Moléculas de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleotido mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NCI	National Cancer Institute
NSAID	Fármacos antiinflamatorios de tipo no esteroide
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos libre de iones calcio y magnesio
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos de pH=7.4
SST	Dominio de unión secuencia específico de p53.
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TNF	Factor de necrosis tumoral
UV	Radiación ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

i. Resumen.

El cáncer es una enfermedad causada por diversos factores tanto físicos, químicos y biológicos que no ha mostrado una disminución en su incidencia en los últimos años. Esta enfermedad resulta de la alteración genética de los oncogenes y de los genes supresores tumorales, lo que conlleva a la transformación de las células normales a células autónomas que proliferan sin control y que pueden generar metástasis en otras partes del cuerpo si el proceso continúa.

Los métodos no quirúrgicos con los que se cuenta actualmente para tratar el cáncer son principalmente la radioterapia y la quimioterapia los cuales se basan en la proliferación rápida de las células tumorales lo cual las hace más sensibles al tratamiento que sus contrapartes normales. La meta de la quimioterapia es utilizar las diferencias bioquímicas entre el proceso patológico y el proceso normal, utilizando fármacos con el fin de bloquear el proceso patológico.

El fenol y los fenoles sustituidos son compuestos que se ha reportado poseen propiedades citotóxicas mediadas por mecanismos pro y antioxidantes. Los aril fosfatos por su parte son sustratos de fosfatasa los cuales pueden producir fenoles sustituidos dentro de las células.

Un grupo de compuestos que ha tenido auge en los últimos años para el tratamiento de algunos tipos de cáncer es el de los taxanos de los cuales el paclitaxel es el más importante. El paclitaxel actúa promoviendo la polimerización de los microtúbulos y la búsqueda de fármacos con un mecanismo de acción similar llevó al descubrimiento de la epotilona. Las dificultades en la obtención de epotilonas en cantidades suficientes han estimulado su síntesis y la elaboración de sus derivados y compuestos relacionados.

En el presente trabajo se determinó la actividad citotóxica de una serie de aril fosfatos, de dos compuestos derivados de fragmentos de la epotilona y de un compuesto fenólico denominado metol en las líneas celulares HeLa, Calo y C-33 de cáncer de cérvix humano, SW480 y SW620 de cáncer colorrectal humano, MCF-7 de cáncer de mama humano y CHO de ovario de hámster chino. Los aril fosfatos y los derivados de la epotilona no presentaron actividad citotóxica relevante en ninguna de las líneas celulares, sin embargo el compuesto metol

presento actividad citotóxica en todas las líneas celulares presentando curvas de inhibición similares. La línea celular más sensible fue la línea celular MCF-7 y la más resistente fue la línea celular Calo. La concentración a la que se presentó el mayor efecto en la línea celular HeLa fue 80 μM con un efecto inhibitorio de 86.22 %, mientras que para la línea celular SW480 fue de 60 μM con un efecto citotóxico de 81.66%, y en la línea celular SW620 se observó el efecto máximo a 100 μM con una inhibición de la viabilidad del 74.70 %.

Las líneas celulares C-33 y CHO tuvieron curvas de inhibición muy parecidas y la citotoxicidad máxima se alcanzó a la concentración de 60 μM con una inhibición de 81.10 % para C-33 y 83.99 % para CHO, la línea más resistente Calo presentó una respuesta al compuesto dosis dependiente con una curva dosis respuesta lineal hasta 100 μM con un efecto de 64.04% de inhibición.

De los datos obtenidos se concluyó que los aril-fosfatos y los compuestos derivados de la epotilona no presentan actividad citotóxica en el rango de las concentraciones utilizadas y que el metol fue activo en todas las líneas celulares siendo más activo en la línea celular MCF-7 y menos activo en la línea celular Calo.

II. Objetivo.

1. Evaluar la posible actividad citotóxica de compuestos de estructura diversa como son los aril-fosfatos, compuestos relacionados con la epotilona y el metol utilizando líneas celulares tumorales humanas y murinas, mediante la técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

III. Hipótesis

Los compuestos derivados de la epotilona, los aril-fosfatos y el metol presentaran actividad citotóxica *in vitro* en las líneas celulares tumorales sobre la base de sus características estructurales.

II. Objetivo.

1. Evaluar la posible actividad citotóxica de compuestos de estructura diversa como son los aril-fosfatos, compuestos relacionados con la epotilona y el metol utilizando líneas celulares tumorales humanas y murinas, mediante la técnica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).

III. Hipótesis

Los compuestos derivados de la epotilona, los aril-fosfatos y el metol presentaran actividad citotóxica *in vitro* en las líneas celulares tumorales sobre la base de sus características estructurales.

IV. Introducción.

Algunas de las funciones de un organismo son el crecimiento, división y muerte celular. Estas funciones se encuentran perfectamente reguladas, la mayoría de manera compleja. La pérdida de la regulación metabólica lleva a diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. El tratamiento del cáncer se lleva a cabo por medio de radioterapia, quimioterapia y/o cirugía. El empleo de diversos fármacos en la quimioterapia produce efectos secundarios no deseados en los pacientes, por lo que la obtención de nuevos compuestos con potencial antitumoral es de gran importancia.

4.1 CÁNCER.

El cáncer es el resultado de la desregulación de los genes que controlan el ciclo celular lo que produce expansión clonal y heterogeneidad clonal (Sporn 1991, Temin y col. 1998).

El cáncer es una enfermedad propia de las células que se encuentran en división constante debido a que los genes necesarios para este proceso se expresan sólo en células en división (Dulbecco 1983). Debido a la gran variedad de órganos que cumplen este requisito, el término cáncer se refiere a alrededor de cien formas diferentes de la enfermedad (Weinberg 1996). Este padecimiento es de origen multifactorial y es un proceso multietapas, por lo que la etiología es diversa.

Cuando las células alteradas crecen sin control da lugar a la invasión del tejido adyacente pudiendo alterar sus funciones (Perera 1996).

El paso inicial para que una célula normal pueda generar cáncer es la alteración de un gen que participa en la regulación del ciclo celular; por medio de mutación, aumento o disminución de la expresión o por fallas en el metabolismo del DNA (Dulbecco 1983, Yokota 2000). Aunque se sabe que la adquisición de una mutación es un paso inicial importante, no es suficiente para generar la enfermedad, pues ésta es un proceso molecular y celular que es dependiente de tiempo y de otras mutaciones por lo que pueden pasar varios años antes de que

las células expresen modificaciones fenotípicas, excepto para el caso del cáncer causado por virus altamente oncogénicos (Darnell y col 1999 ,Lewin 1997, Sporn 1991, Temin 1988). En tumores sólidos la clona inicial forma pequeños acumulos de células con características fenotípicas idénticas al tejido de donde proviene los cuales se llaman adenomas y son de tipo benigno (Vogelstein y col. 1993).

Durante la progresión tumoral la acumulación de mutaciones en diversos genes lleva a la pérdida de regulación en el metabolismo del DNA. La inestabilidad genética esta muy bien documentada y se ha demostrado que las células tumorales presentan cientos de mutaciones a lo largo del genoma, las cuales se presentan de forma aleatoria, y al parecer la presencia del fenotipo mutador debe ser un evento temprano en el proceso de carcinogénesis (Loeb y col. 2000). También se presentan cambios a nivel cromosómico como aneuploidía, translocación, inversión, cromosomas en anillo, etc. (Filatov y col 1998). Esta inestabilidad cromosómica se debe a defectos en la replicación del DNA, segregación, reparación y recombinación (Filatov y col 1998, Pihan y col. 1999) y también ha sido asociada con la erosión de los telómeros durante el envejecimiento celular (Filatov y col 1998). Esto ocasiona que la regulación de los genes se pierda y se empiecen a expresar proteínas que no lo hacen normalmente en el tejido de donde proviene la neoplásia o lo hacen en otra etapa de la vida del organismo. Muchas de estas proteínas pueden ser utilizadas como marcadores tumorales las cuales indican que el proceso tumoral se esta llevando a cabo (Dulbecco 1983)..

Durante esta etapa se van generando clones que pueden tener menos ventajas que otras, por lo que dentro del tumor existe una selección de las más aptas y con mayor pérdida de las características del tejido de origen (Dulbecco 1983). Al crecer el número de células, el tumor empieza a aumentar en volumen y cuando alcanza un tamaño de 1 a 2 mm en diámetro puede aún subsistir por la difusión de nutrientes de vasos cercanos (Kerbel 2000), pero al crecer más se encuentra con limitantes para su desarrollo tales como limitación por el tejido adyacente y reducción de la cantidad de nutrientes, oxígeno y factores de

crecimiento (Loeb y col. 2000). La falta de oxígeno genera un estado de hipoxia, lo que favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante un proceso llamado angiogénesis, el cual se lleva a cabo mediante degradación de la lamina basal de los capilares cercanos, división de células endoteliales y formación de capilares en el tumor (Darnell y col. 1999).

La formación de esta nueva vasculatura es irregular en la organización de las células endoteliales con vasos ciegos, uniones no necesarias y oclusiones temporales (Brown y col. 1998). La formación de la vasculatura se debe a la secreción ectópica por parte de las células tumorales de factores angiogénicos como los factores de crecimiento ácido y básico de fibroblastos (aFGF y bFGF respectivamente), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF α y β), interleucina 8 y angiogéninas (Brown y col. 1998, Kerbel 2000). Cabe resaltar que el VEGF es expresado mayoritariamente por casi todos los tipos de tumores, y que la angiogénesis no es exclusiva de tumores sólidos (Kerbel 2000).

En pacientes con cáncer se ha encontrado que los niveles sanguíneos de VEGF son mayores que en los pacientes sin este padecimiento, y que éste se encuentra dentro de plaquetas y leucocitos. Encontrar esta proteína se ha asociado con un pronóstico desfavorable (Salven y col. 1999). El VEGF también aumenta la permeabilidad de la vasculatura por lo que se favorece la extravasación de las células tumorales y la metástasis (Brown y col. 1998, Salven y col. 1999).

La diseminación de las células tumorales de su sitio de origen a otro u otros sitios del organismo y su establecimiento se denomina metástasis. Para que las células sobrevivan deben estar rodeadas por células similares debido al fenómeno conocido como reconocimiento célula - célula y aquellas que no cumplen este requisito mueren (Ruoslahti 1996). Las moléculas de adhesión que participan en este proceso son varias, pero las más importantes son las moléculas de adhesión célula - célula (CMA's) y las cadherinas, ambas dependientes de Ca^{2+} (Freshney 1994a). Además, los tejidos son separados por láminas basales las cuales separan epitelios internos y externos (Darnell y col. 1999).

Para que una célula pueda generar metástasis es necesario que rompa todas estas barreras, por lo que las células tumorales pierden la dependencia a la unión con células similares, se produce rompimiento de la membrana basal por medio de metaloproteínas tales como el activador del plasminógeno. Al penetrar la membrana basal de los tejidos, la de los vasos sanguíneos y las células endoteliales de la vasculatura la célula se encuentra en el torrente sanguíneo, por el cual se transporta a otros órganos. Al ser transportada por el torrente sanguíneo la célula debe adherirse a las células endoteliales de otro vaso y penetrar hasta llegar al mesénquima del tejido y reproducirse (Ruoslahti 1996). De todas las células que se liberan sólo unas pocas forman focos metastásicos debido a que probablemente no son aún por completo independientes en su unión, y las que lo logran además de ser independientes a la unión expresan proteínas nuevas o variantes en sus membranas que les permitan el anclaje y reconocimiento de otros tejidos (Darnell y col. 1999, Ruoslahti 1996).

La capacidad de generar metástasis es lo que lleva generalmente al organismo a la muerte (Perera 1996). Es importante decir que el tumor primario secreta factores antiangiogénicos para inhibir la angiogénesis en los focos metastásicos, por lo que si el tumor primario se remueve se puede estimular el crecimiento de los tumores secundarios (Darnell y col. 1999).

4.1.2. Oncogenes y genes supresores tumorales.

Como ya se había mencionado el cáncer es el resultado de la alteración de genes que regulan el metabolismo a través del control del ciclo celular. Estos genes se dividen en dos tipos: los oncogenes y los genes supresores tumorales.

Los oncogenes tienen un efecto positivo sobre el ciclo celular y fueron descubiertos en virus oncogénicos (Weinberg 1996), después se encontró su contraparte normal en el genoma de las células normales los cuales fueron llamados proto-oncogenes (Lewin 1997). Los oncogenes codifican para varios tipos de proteínas, algunas rompen la regulación de las cascadas de señalización y por otra parte existen las que activan los factores de transcripción y aquéllas que inhiben la apoptosis (Weinberg 1996).

Los proto-oncogenes se denominan oncogenes cuando se encuentran alterados y por tanto la proteína que codifican es capaz de transformar a la célula (Lewin 1997). Esta transformación se da por una ganancia en la función del gen lo cual puede ser resultado de mutaciones, amplificaciones del gen o translocación cromosómica; la mutación en un solo alelo es suficiente para activar al proto-oncogen (actúan de manera dominante) (Darnell y col. 1999).

En cambio los genes supresores tumorales, los cuales también son llamados antioncogenes u oncogenes recesivos, regulan el ciclo celular de forma negativa. El término oncogen recesivo es más ilustrativo que los términos antioncogen y gen supresor tumoral, ya que estos términos proponen que estos genes existen para contrarrestar el efecto de los oncogenes, y esto no es lo que pasa realmente (Marshall 1991), aunque se usa el término de gen supresor tumoral por ser el más utilizado.

Los genes supresores tumorales tienen la función de verificar la integridad del DNA y de decidir cuando la célula puede seguir dividiéndose en los puntos de control del ciclo celular (Darnell y col. 1999).

Para que las células lleguen a ser malignas deben también evadir o no ser sensibles a la acción de los genes supresores tumorales (Weinberg 1996), por lo que su alteración debe ser la pérdida de función de ambos alelos (Lewin 1997) de ahí que se prefiera el término de oncogen recesivo.

Las líneas de investigación que han apoyado la idea de la regulación negativa del ciclo celular son la formación de células híbridas, cáncer hereditario y la pérdida de la heterocigosidad (LOH). (Marshall 1991). Cuando un alelo pierde su actividad, ya sea por delección, mutación o sea inactivo y se pierde la función del segundo alelo se habla de LOH. (Ritland y col. 1997).

4.1.3. Etiología del cáncer.

Los tejidos diversos de los organismos mantienen un número de células constante lo cual es controlado mediante complejos sistemas de regulación de la proliferación y muerte celular (Thompson 1995). Durante la proliferación celular el material genético se replica, y la célula pasa por diferentes fases: la fase G1 (entre

M y S) la fase S (síntesis), la fase G2 (entre S y M) y la fase M (mitosis). Existen dos puntos de control principales del ciclo celular que aseguran que la replicación del DNA se realice de la manera más fiel posible; la interfase G1/S y la interfase G2/M (Norbury y col. 1992). Cuando la célula detecta daño en el DNA o un metabolismo inapropiado del DNA se promueve la detención del ciclo en estos puntos de control para tomar la determinación de reparar el daño o ir a un mecanismo de suicidio o muerte celular programada (Filatov y col. 1998)

Por otro lado, para mantener la homeostasis es necesario eliminar células dañadas, infectadas o redundantes, esto se lleva a cabo mediante un mecanismo de muerte celular interno llamado apoptosis (Adams y col. 1998). La apoptosis es un modo de muerte celular programada donde el contenido de la célula muerta es mantenido dentro de membranas, las cuales son fagocitadas rápidamente (Thompson 1995).

La gran mayoría del cáncer resulta por interacciones del organismo con el medio ambiente, y este es definido como todos los factores externos que afectan a un individuo (incluyendo factores económicos, culturales y sociales) (Perera 1997, WHO 1999). Esto se infirió de la observación de que personas que fuman padecen más enfermedades crónicas y cáncer en comparación con personas que no fuman, de hecho para apreciar el daño que puede ocasionar fumar, se tiene que el tabaco causa la muerte de la mitad de las personas que comienzan a fumar en la adolescencia y continúan durante su vida fumando, y para el año 2020-2030 habrá una muerte asociada al tabaco cada tres segundos (Farber 1987, WHO 1999). También se ha deducido de la observación de que grupos étnicos que emigraban a otra parte del mundo adquieren el patrón de frecuencia del cáncer de su nuevo lugar de residencia (Farber 1987).

Las causas hereditarias por sí mismas explican solo cerca del 5% de todos los casos reportados (Perera 1987).

4.1.3.1. Carcinogénesis por agentes químicos

Las sustancias químicas que pueden causar cáncer son llamadas carcinógenos químicos, y son divididos en dos clases: genotóxicos y no genotóxicos

4.1.3.1.1. Carcinógenos químicos genotóxicos.

Los carcinógenos químicos genotóxicos son aquéllos que son capaces de generar cambios en el DNA, por lo tanto pueden causar mutaciones en los genes supresores tumorales y los oncogenes. Estos pueden ser detectados por la prueba de Ames y otras pruebas *in vivo* e *in vitro* (Green 1992).

La carcinogénesis química ha sido dividida en tres fases: iniciación, promoción y progresión (Pitot y col. 1996).

La iniciación se refiere al daño que ejerce la sustancia en macromoléculas especialmente el DNA. Los agentes químicos son capaces *per se* de ejercer el daño, o por activación metabólica, tanto de enzimas del metabolismo de xenobióticos de fase I (oxidación, reducción, hidrólisis) y de fase II (conjugación con sulfato, ácido glucurónico, etc.) generando sustancias electrófilas que afectan al DNA. Si la alteración en el DNA no se corrige ésta es irreversible y se dice que la célula se ha iniciado (Farber 1987, Pitot y col. 1996)

La promoción necesita de sustancias que no generan genotoxicidad por sí mismas; tales como ésteres de forbol, fenobarbital, sacarina, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) y hormonas esteroides (Pitot y col. 1996). Estas sustancias favorecen la expansión clonal de las células iniciadas, lo que puede generar neoplasias. Este proceso a diferencia de la iniciación es reversible si el agente promotor se deja de producir o administrar (Farber 1987).

La última fase es la transición de la célula iniciada hasta el fenotipo maligno, lo cual sucede por efecto de la promoción y la inestabilidad genómica resultantes descritas anteriormente. De hecho estas etapas aunque fueron descritas para la carcinogénesis química son aplicables al cáncer surgido por otras causas (Green 1992).

4.1.3.1.2. Carcinogénesis química no genotóxica (Green 1992).

La carcinogénesis no genotóxica se refiere a sustancias que pueden activar receptores intracelulares, mimetizando al ligando natural, y por efecto de la

estimulación inapropiada se puede generar cáncer, o por la promoción de células iniciadas con anterioridad.

También se ha propuesto que pueden inhibir la diferenciación terminal de las células, por lo tanto pueden responder a señales proliferativas por más tiempo del que lo hacen normalmente, lo que puede generar carcinogénesis.

En otros casos las sustancias químicas alteran la expresión de genes que pueden alterar el metabolismo y generar sustancias oxidantes, o aumentar la activación metabólica de carcinógenos químicos.

4.1.3.2 Carcinogénesis por agentes biológicos.

La carcinogénesis por agentes biológicos infecciosos y por el consumo de tabaco cuentan con la mayor proporción de casos en el mundo; y los casos atribuibles a agentes biológicos son de aproximadamente 9% en países desarrollados y de 23 % en países en desarrollo, de estos el 90 % esta asociado al virus del papiloma humano (HPV), al virus de la hepatitis B (HBV) y a *Helicobacter pylori* (WHO 1999).

Los virus oncogénicos pueden causar cáncer por lo menos por tres mecanismos:

- a) El virus durante su evolución integra en su genoma un oncogen por recombinación con los genes del hospedero. En infecciones posteriores el oncogen es sobreexpresado al transcribirse junto con los genes virales, entonces esta célula puede escapar del control celular y causar cáncer (Dulbecco 1983).
- b) Si el virus no posee genes análogos de los oncogenes puede causar cáncer integrando su genoma cerca de regiones que codifican para oncogenes, y por medio del promotor viral se aumenta la transcripción de dicho gen. Este fenómeno se observa en retrovirus que causan leucemias, debido a que la integración es un proceso aleatorio puede pasar mucho tiempo entre el inicio de la infección y la transformación de una célula (Darnell y col. 1999, Dulbecco 1983).

c) Por la inactivación de proteínas codificadas por genes supresores tumorales, tal es el caso del HPV-16 y el SV40, los cuales alteran la función de los genes supresores tumorales P53 y Rb respectivamente. En el caso de HPV-16 se expresa una proteína llamada E6 que se une a P53 y la conduce a su degradación por ubiquitinación, mientras que la proteína E7 del mismo virus se une Rb, la pérdida de la función de P53 aumenta considerablemente el desarrollo de cáncer (Filatov y col. 1998).

4.1.3.3. Carcinogénesis por agentes físicos

Este tipo de carcinogénesis es causada principalmente por radiación de tipo ionizante y luz ultravioleta (UV) (Rauth 1991).

La radiación ionizante crea productos radiolíticos del agua, por ejemplo el radical hidroxilo, el radical hidronio y el radical peroxihidronio, además se producen especies reactivas de oxígeno. Estas especies altamente inestables pueden alterar la estructura de las macromoléculas celulares, por reacción con el DNA produciendo modificaciones. Por otro lado la radiación ionizante rompe las cadenas dobles o sencillas del DNA, a través del enlace fosfodiéster y de este modo se altera su estructura química por la pérdida de bases (Rauth 1991).

La luz UV induce la formación de dímeros de piridina adyacentes, llamados fotoproductos, los cuales pueden tener la forma de ciclobutano o estar unidos por medio de un enlace 6-4 formado entre piridinas adyacentes, aunque este daño puede ser reparado por escisión, la exposición prolongada a los rayos UV esta asociada con el cáncer de piel (Wani 1999).

Además de la luz UV y las radiaciones ionizantes, otros agentes que causan lesiones constantes pueden generar cáncer al inducir estados hiperproliferativos en los tejidos, como fibras insolubles que irritan la mucosa del colon distal después de que la mayoría del agua se ha absorbido (Harris y col. 1993), o por el consumo de té extremadamente caliente, el cual se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de esófago (WHO 1999).

La susceptibilidad de padecer cáncer depende del ambiente del individuo y además de la edad, raza, género, del estado de salud general y del estado

nutricional; aunado a factores genéticos que aumentan la probabilidad de padecer cáncer por la pérdida o inactivación de genes supresores tumorales, reparación deficiente del DNA o un metabolismo alterado de sustancias genotóxicas (Perera 1997).

La evolución del proceso neoplásico se representa en la fig. IV-1.

4.1.4. Otros aspectos del cáncer.

Con el uso clínico de los antibióticos después de la segunda guerra mundial, la longevidad del hombre aumentó debido a la disminución de la mortalidad por infecciones bacterianas, principalmente la neumonía, esto causó que la mortalidad por cáncer y enfermedades cardíacas se incrementaran y ocuparan los primeros lugares en mortalidad (Fig. IV-2)(Suffness y col. 1995).

En las últimas décadas las afecciones cardíacas han disminuido, mientras que el cáncer no (WHO 1999), y se calcula que para el año 2020 la incidencia y mortalidad a causa del cáncer se incrementarán al doble de las actuales y de estos casos el 70% se presentará en países en desarrollo (Jones 1999). La situación del cáncer en países desarrollados y en desarrollo es muy diferente, ya que en los primeros la mayor tasa de casos es en cáncer de pulmón, colon y recto, mama, estomago y próstata y en los segundos se encuentran los de estomago, pulmón, hígado, mama y cérvix, en el orden decreciente mencionado. Por otro lado en los países no industrializados cerca del 80 % de los casos de cáncer son detectados cuando la enfermedad es avanzada (Jones 1999).

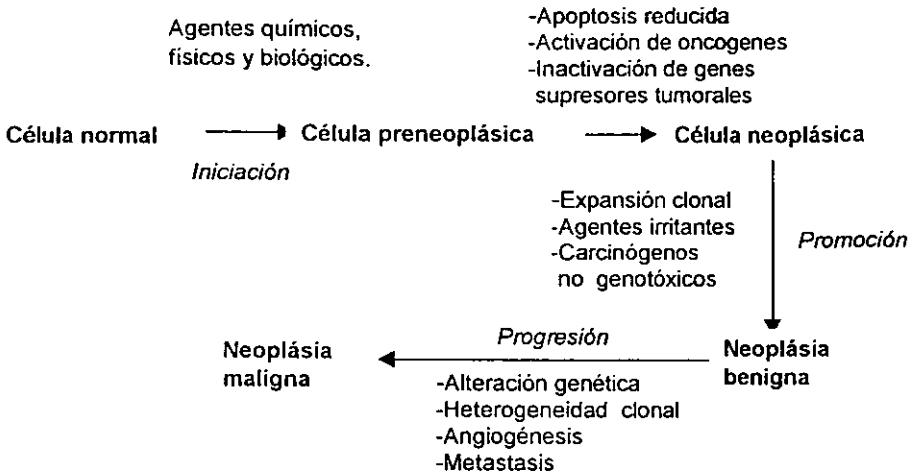


Fig. IV-1. El proceso neoplásico es multietapas, multifactorial y al azar. Una célula normal puede convertirse en neoplásica por su interacción con agentes físicos, químicos o biológicos, lo cual inicia a la célula y le confiere una probabilidad mayor de malignización. Al promoverse la división celular la célula iniciada forma un foco neoplásico benigno, el cual puede progresar hasta un fenotipo maligno esta promoción no es controlada por las células tumorales y cualquier ventaja fenotípica es un proceso totalmente aleatorio.

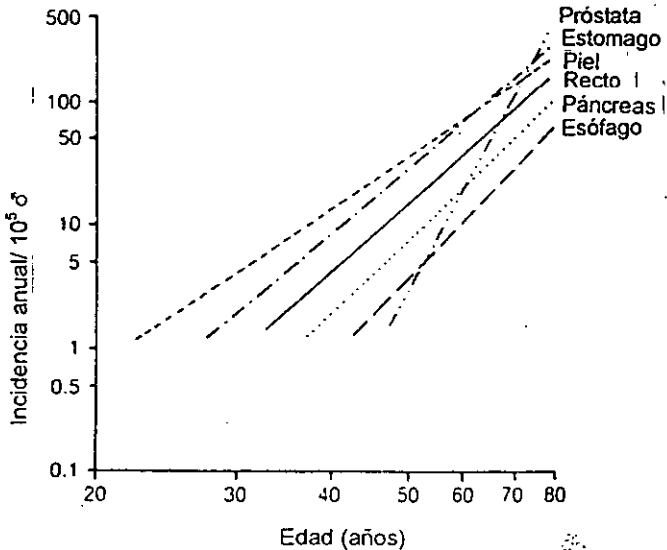


Fig. IV-2. Incidencia del cáncer con respecto a la edad. En la figura se muestra como el cáncer aumenta su incidencia con la edad. En el texto se menciona que el proceso de carcinogénesis puede necesitar hasta dos décadas en desarrollarse por eso las neoplasias se manifiestan mayoritariamente en la edad adulta (Vogelstein y col. 1993).

4.2 Quimioterapia del cáncer.

4.2.1 Quimioprevención.

La quimioprevención del cáncer es el uso de compuestos no tóxicos para evitar el proceso neoplásico mediante su prevención, retardo o reversión (WHO 1999), ésta puede ser aplicada en cualquier momento de la carcinogénesis y los avances en biología celular y molecular son los que van a proveer los mecanismos para la prevención (Hong y col. 1997).

Los compuestos que prevengan el daño al DNA por carcinógenos genotóxicos son los más apropiados para la quimioprevención. De estos compuestos se ha utilizado la N-acetilcisteína para aumentar los niveles de glutatión, y al Oltipraz el cual es un compuesto que evita el estrés oxidativo e inhibe a los citocromos P450 (WHO 1999).

Para el caso en que el daño genotóxico haya ocurrido, o se está predispuesto al cáncer por cuestiones hereditarias, se están probando compuestos que reviertan el proceso de carcinogénesis, como los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), principalmente la COX-2 para el cáncer colorrectal, moduladores de receptores de estrógenos para cáncer dependiente de hormonas y análogos de retinoides para cáncer de epitelio de vías respiratorias (Hong y col. 1997).

Un grupo de fármacos con efecto preventivo del cáncer colorrectal son los fármacos antiinflamatorios de tipo no esteroide (NSAID), los cuáles se ha comprobado que disminuyen la incidencia de este tipo de cáncer (Jackson y col. 1999), y en ratones APC^{Min}, los cuales desarrollan cáncer colorrectal a los 100 días de edad, fueron tratados con sulindac bajo diferentes esquemas de tratamiento y al contar el número de tumores desarrollados se encontró una disminución significativa del número de éstos con respecto a los controles, y en aquéllos que ya habían desarrollado neoplasias previamente se observó una regresión de los mismos (Ritland y col. 1999). Aunque este tipo de fármacos poseen efectos adversos en el tracto gastrointestinal como ulceración y perforación su desarrollo aún continúa (Jackson y col. 1999).

Por otro lado el consumo de frutas y verduras se ha observado que posee actividad antioxidante, y polisacáridos de plantas, como el Aloe, se ha encontrado en experimentos *in vitro* en líneas celulares tumorales que presentan actividad antimutagénica y antiproliferativa (Kim y col. 1999).

4.2.2 Fármacos antineoplásicos.

La quimioterapia es una herramienta importante para tratar el cáncer, y su objetivo es atacar las diferencias bioquímicas existentes entre el proceso neoplásico y las células normales con el fin de interferir lo más selectivamente posible con la enfermedad (Mathews y col. 1996).

Los fármacos citotóxicos actúan sobre células en proliferación (sin embargo no todos lo hacen), por lo que se formuló la hipótesis que los tumores con alta división celular son más susceptibles al tratamiento, al igual que los tejidos sanos con alto recambio, como la piel, médula ósea, folículos pilosos y epitelio (Chabner y col. 1996). Pero lo anterior no es cierto para todos los casos, ya que algunos tumores de alta proliferación son insensibles al tratamiento y algunos de lento crecimiento son sensibles a éste (Brown y col. 1998, Fisher 1994, Waldman y col. 1997). La forma en que los fármacos citotóxicos se pensó que disminuían el tamaño del tumor era por necrosis (Waldman y col. 1997) la evidencia actual señala que es la muerte celular programada por apoptosis el mecanismo responsable por el que las células tumorales mueren (Kolenko y col. 2000, Lowe y col. 2000, Sen y col. 1992, Thompson 1995, Waldman y col. 1997), aunque algunos fármacos inducen necrosis a concentraciones elevadas y apoptosis a concentraciones bajas (Hirsch y col. 1997).

Algunos de estos fármacos actúan sobre una fase específica del ciclo celular, por ejemplo la vincristina, la vinblastina y el paclitaxel son específicos de la fase M; el metotrexato, 5-fluorouracilo e hidroxiurea son específicos de la fase S y el cisplatino, los agentes alquilantes, análogos y antagonistas hormonales no son específicos de alguna de las fases debido a que causan daño inespecífico al DNA o a que inhiben la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación (Chabner y col. 1996).

4.2.2.1. Apoptosis

Las células mueren de diversas maneras, hasta ahora se han descrito dos formas que son la apoptosis y la necrosis (Green y col. 2000, Hirsch y col. 1997, Kinloch y col.1999, Thompson 1995), y adicionalmente se puede mencionar a la senescencia, término que se refiere a un estado de detención del ciclo celular permanente, que aunque propiamente dicho no es una muerte celular evita que la célula que está en senescencia pueda generar un proceso hiperplásico (Filatov y col. 1998, Lowe y col. 2000).

La apoptosis se diferencia de la necrosis en la forma ordenada en que ocurre, durante la apoptosis el contenido celular se mantiene dentro de membranas por lo que éste nunca es liberado, mientras que en la necrosis la célula estalla liberando su contenido el cual puede ser perjudicial para el organismo (Hirsch y col. 1997, Hoffman 1999, Kinloch y col. 1999, Thompson 1995). Las características de la apoptosis son: reducción del volumen celular, formación de cuerpos apoptóticos, condensación de la cromatina, fragmentación del DNA (Kinloch y col. 1999, Lowe y col. 2000), pérdida de la función mitocondrial (Costantini y col. 2000, Hirsch y col. 1997, Reed y col. 1998) y exposición de fosfatidilserina en la cara exterior de la membrana citoplasmática (Fadok y col. 2000, Green y col. 2000, Woo y col. 1998). Por otra parte, las células muertas son fagocitadas rápidamente (Green y col. 2000, Hoffman 1999, Jacobson y col. 1997, Reiter y col. 1999) pero las células apoptóticas, al contrario de las necróticas no inducen reacciones inflamatorias (Fadok y col. 2000, Green y col. 2000, Reiter y col. 1999).

La apoptosis posee funciones fisiológicas importantes, este proceso participa durante el desarrollo en la formación del organismo (embriogénesis), eliminando estructuras que no son necesarias para el organismo (involución), en la eliminación de células dañadas, ajustando el número de células que integran un tejido u órgano (Jacobson y col. 1997, Sen y col. 1992) y para la eliminación de células que no se encuentran en lugares apropiados (Hoffman 1999). Adicionalmente, la apoptosis es el mecanismo por el cual los linfocitos T que no

reconocen los MHC's propios o son autorreactivos se eliminan (Janeway y col. 1999a). Por otro lado, la apoptosis es un mecanismo de defensa contra células con daño al DNA o que se encuentran en estados de hipoxia o estrés oxidativo (Hoffman 1999), también ésta involucrada en la eliminación de infecciones intracelulares y en la eliminación de aloinjertos y heteroinjertos, en el caso de animales multicelulares superiores este proceso apoptótico se regula por los linfocitos T citotóxicos (Janeway y col. 1999b).

La apoptosis es un proceso crítico para mantener la homeostasis corporal, pero también es crítico en ciertos procesos patológicos como el cáncer, autoinmunidad e infecciones virales donde la apoptosis está disminuida. También se encuentran los desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer, desórdenes hematológicos como la anemia aplásica y el SIDA que presentan un incremento en la muerte celular (Thompson 1995).

La proliferación celular parece ir a la par de la muerte celular, esto se ha comprobado en células normales que sobreexpresan a la proteína c-myc y sufren apoptosis ante la eliminación de suero del medio de cultivo en mayor proporción que las células que no sobreexpresan esta proteína, células normales que sobreexpresan a la proteína Ras sufren arresto celular y apoptosis. Además, células que sobreexpresan a Bcl-2, que reprime la apoptosis, tienen mayor dificultad en entrar al ciclo celular y las que sobreexpresan Bax, que induce apoptosis, aceleran la entrada al ciclo celular (Evan y col. 1998, Lowe y col. 2000). Esto indica que el proceso de apoptosis y la división celular son procesos acoplados, y lo que decide cuando una célula vive o muere es la intensidad de las señales antiapoptóticas, provenientes de células vecinas, o las señales proapoptóticas del proceso de división (Evan y col. 1998).

El estudio de genes que afectan la muerte celular por apoptosis en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* llamados *ced* estimuló la búsqueda de sus homólogos mamíferos (Woo y col. 1998, Sen y col. 1992), los cuales fueron encontrados y esto indicó que el mecanismo de apoptosis es conservado en la evolución (Adams y col. 1998, Jacobson y col. 1997). La apoptosis es dependiente

de energía (Kinloch y col. 1999) y puede ser suprimida por inhibidores de la síntesis de proteínas o RNA en algunos casos (Sen y col. 1992).

La apoptosis se lleva a cabo en varias etapas: una fase de iniciación que es muy heterogénea, una fase de decisión y una de degradación o ejecución (Costantini y col 2000).

La fase de iniciación puede ser causada por señales extrínsecas debido a la presencia de receptores e intrínseca para eliminar células con daño metabólico o al DNA.

La apoptosis por factores extrínsecos esta mediada por receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Ashkenazi y col. 1998). Los más estudiados de esta familia son los receptores TNF-R1 y Fas. Estos receptores al unir su ligando se trimerizan a través de dominios de muerte (DD), después de la trimerización se unen proteínas asociadas al dominio de muerte (TRADD o RIP para TNF y FADD para Fas) las cuales contienen dominios efectores de muerte (DED) (Ashkenazi y col. 1998, Hoffman 1999).

La procaspasa-8 se une a las proteínas asociadas al DD por el DED, al crearse estos complejos la proximidad entre zimógenos de caspasa 8, que poseen una actividad proteolítica baja, lleva a la formación de la caspasa 8 por autoproteólisis (Hoffman 1999, Hengartner 2000). El DED es homologo de dominios llamados dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) que se encuentra presente en las caspasas 1, 4, 5, 9, 11, 12 y 13 (Hoffman 1999).

La falta de factores de crecimiento, perturbación en el ciclo celular, daño al DNA, desgaste de los telómeros, quimioterapia, radioterapia y señales de proliferación oncogénicas inician procesos intrínsecos de muerte celular programada. La falta de factores de crecimiento desencadena muerte celular sin posibilidad a otra opción debido a las señales proapoptóticas del ciclo celular (Lowe y col. 2000), mientras que la hipoxia y el daño al DNA son dependientes de la proteína P53 (Brown y col. 1998)

La proteína P53 es un factor de transcripción que posee tres dominios: el dominio amino terminal o de transactivación de la transcripción, el dominio de unión secuencia específico al DNA (SST) y el dominio carboxilo terminal que es el

responsable de la tetramerización (P53 es un tetrámero), de la localización nuclear y del reconocimiento de daño al DNA (Peller 1998) y se postula que P53 puede adoptar dos configuraciones funcionales al menos *in vivo* (Milner 1995).

P53 regula el ciclo celular por detención de éste en la fase G1, por inducción del gen $p21^{WAF/CIP1}$, y en la fase G2. También decide cuando la célula debe sufrir apoptosis y esta decisión está influenciada por el tipo celular, la composición oncogénica, los estímulos extracelulares, la intensidad del insulto a la célula, los niveles de expresión de P53 y su interacción con otras proteínas reguladoras o secuencias P53 específicas (Sionov y col. 1999).

La proteína P53 induce la expresión de proteínas proapoptóticas como Bax, IGF-BP3, Fas y reprime la expresión de Bcl-2, IGF-IR, MAP-4 y prescribina-1, esta actividad es regulada por el dominio SST, aunque P53 sin dominio SST es funcional o células que se incuban en presencia de inhibidores de la síntesis de RNA o proteínas también son capaces de sufrir apoptosis debido a p53 por un mecanismo poco conocido (Sionov y col. 1999).

La proteína p53 regula genes de la familia *bcl-2* para ejercer su efecto apoptótico, esta familia de genes se dividen en proapoptóticos en los cuales se incluyen a las proteínas Bax, Bak y Box de la subfamilia Bax y Bck, Blk, Hrk, Bcl-x_s, BNIP3, Bim, Bad y Bid de la subfamilia BH3; y en antiapoptóticos los cuales incluyen a las proteínas Bcl-2, Bcl-x_l, Bcl-w, MCL-1 y A1 que pertenecen a la subfamilia Bcl-2 (Adams y col 1998). Los ratones "knock out" de *bcl-2* son normales al nacer pero en el lapso de una semana se distinguen de los ratones *bcl-2*^{+/+} y mueren a las pocas semanas, éstos presentan riñones poliquísticos, inmunodeficiencia e hipopigmentación, los ratones *bcl-x*^{-/-} mueren antes del nacimiento por muerte masiva de células del sistema nervioso central y de las células linfáticas, los ratones *bax*^{-/-} son ratones sanos que presentan hipo e hiperplasias dependiendo del tipo celular (Yang y col. 1996).

Estos genes regulan la muerte celular dependiendo de la relación apoptótico/antiapoptótico de la cantidad de proteínas de la familia Bcl-2. Se pensó que estas proteínas formaban homodímeros y heterodímeros entre ellos, de esta forma cuando la relación de proteínas Bax/Bcl-2 es menor a 1 se encontraban

homodímeros Bcl-2:Bcl-2 en forma mayoritaria dentro de la célula y ésta sobrevive, pero si la razón Bax/Bcl-2 es mayor a 1 se producen más homodímeros Bax:Bax y la célula moría, y cuando los heterodímeros Bax:Bcl-2 eran los que prevalecían entonces la célula se encontraba en un estado de indecisión (Yang y col. 1996), aunque la demostración de que el detergente utilizado en la lisis de las células interfiere con la dimerización (Hsu y col. 1997) y también el hecho de que se demostró que Bcl-2 es una proteína monomérica ante cualquier estímulo (Conus y col. 2000) ha creado controversia sobre si esto realmente pasa en condiciones fisiológicas.

La proteína Bcl-2 está localizada en las membranas del retículo endoplásmico, de la membrana nuclear y la membrana externa de la mitocondria mientras que Bax es citosólica. Bax es monomérica, aunque se ha encontrado *in vitro* que puede formar multímeros de orden superior (Conus y col. 2000), y después de un estímulo apoptótico Bax se transloca a la mitocondria, previa dimerización pues sí se forman dímeros artificiales de Bax se mimetiza el estímulo apoptótico (Gross y col. 1998).

Bcl-2 está relacionado con el mantenimiento de la función de la mitocondria, y la sobreexpresión de Bax y su translocación a la mitocondria causa dos efectos importantes. El primero es la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y dependiendo de la intensidad de ésta la célula puede morir por necrosis o apoptosis (Hirsch y col. 1997). La transición de la permeabilidad está causada por un incremento en el $\Delta\psi$ que puede estar relacionado con el hinchamiento de la mitocondria y de la falla de intercambio de ADP por ATP con una subsecuente disminución del $\Delta\psi$ (Li y col. 1999) a lo que le sigue la liberación de citocromo c de la mitocondria, aunque esta salida se observa también en mitocondrias con $\Delta\psi$ normal (Martinou y col. 2000). La liberación del citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIF) marcan el segundo evento controlado por la familia Bcl-2 (Reed y col. 1998). El citocromo c se une a Apaf-1 lo cual causa la activación de la pro-caspasa 9 (Hengartner 2000)

Las caspasas son cisteín proteasas que se encuentran como zimógenos con prodominios grandes, p20, y subunidades catalíticas pequeñas, p10. Las

caspasas 8 y 9 degradan a la procaspasa 3 para activarla y la procaspasa tres degrada otras proteínas para activarlas o inactivarlas, entre éstas se encuentran: la DNAsa activada por caspasas, lamininas nucleares, citoesqueleto, PARP y PAK2. Esta serie de degradaciones son las que causa la morfología característica de la apoptosis (Hengartner 2000).

Las caspasas pueden ser inhibidas por proteínas de la familia IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis), al unirse a la caspasa 3 ó 7, caspasas que se activan río arriba, de esta manera inhiben la apoptosis causada por Fas o Bax y sobreexpresión de una proteína de esta familia llamada survivina esta correlacionada con enfermedades neoplásicas más agresivas (Tamm y col. 1998). Para regular la actividad de las IAP se libera de la mitocondria a la proteína DIABLO/Smac (Hengartner 2000).

La proteína P53 puede causar apoptosis sin la participación de Bax, por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) la cual es inhibida por Bcl-2. Por lo que a Bcl-2 también se le atribuye actividad antioxidante (Li y col. 1999).

Otra forma de inducir apoptosis es por medio de linfocitos T citotóxicos (CTL). Al reconocer células extrañas o infectadas, los CTL liberan citotoxinas, una de ellas, la perforina, genera poros en la membrana por la formación de multímeros por donde las otras citotoxinas, las granzimas, son introducidas a la célula. La granzima B entonces activa por proteólisis a la caspasa-3 desencadenando la serie de eventos propios de la muerte celular programada (Janeway y col. 1997b). El proceso de apoptosis se representa en la figura IV-3

Por último las células son fagocitadas por macrófagos a través del reconocimiento de fosfatidilserina, la unión de fosfatidilserina causa la liberación de citocinas inmunodepresoras (TGF- β) e inhibe la liberación de citocinas inflamatorias (TNF- α) por parte de las células fagocíticas (Fadok y col. 2000). Este proceso de ingesta de células apoptóticas causa una reducción en la citotoxicidad contra células tumorales por parte de las células del sistema inmune y de hecho en cultivo causan un incremento en el crecimiento de células tumorales (Reiter y col. 1999).

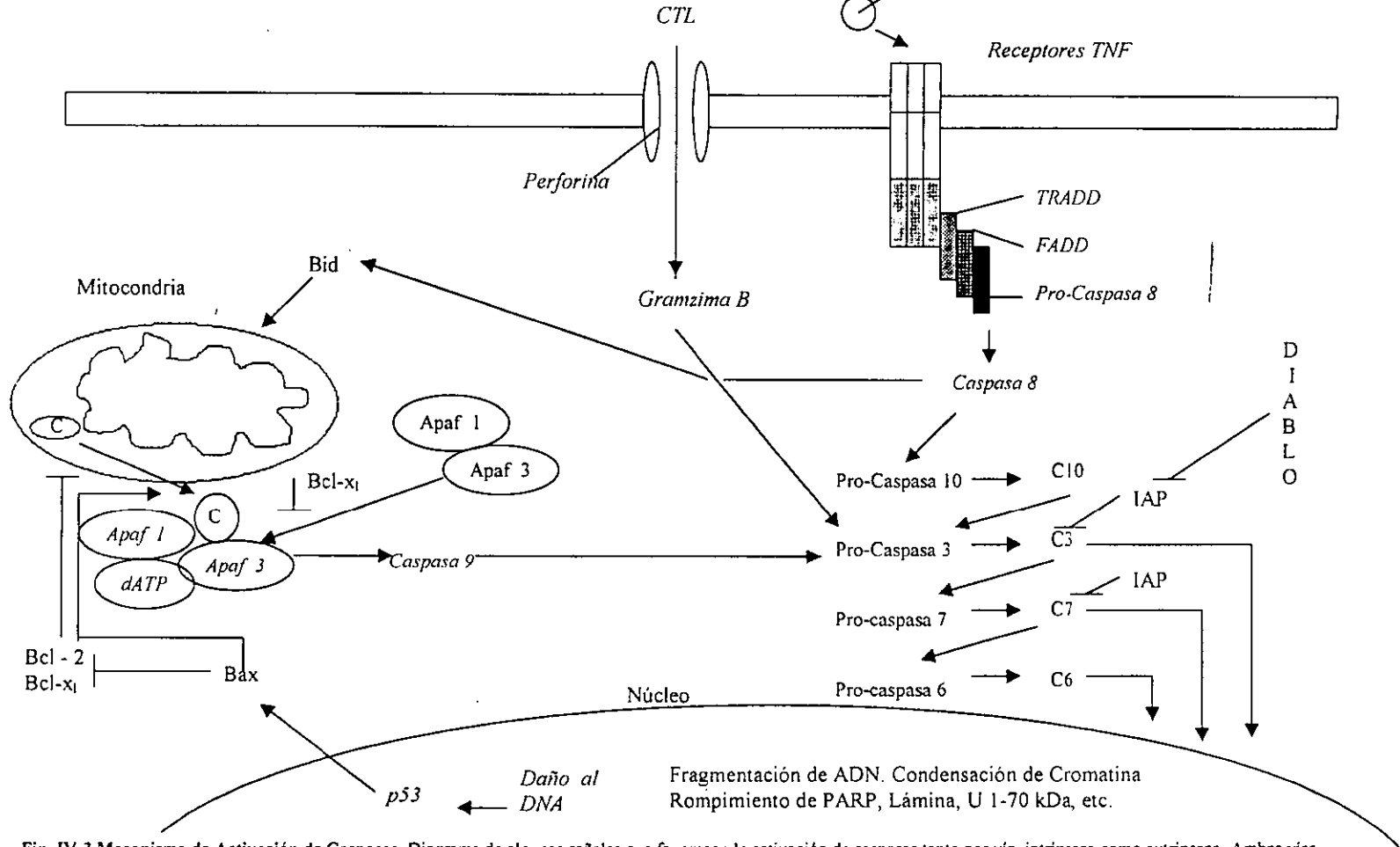


Fig. IV-3 Mecanismo de Activación de Caspasas. Diagrama de algunas señales que favorecen la activación de caspasas tanto por vía intrínseca como extrínseca. Ambas vías desencadenan la activación de la pro-caspasa 3 y la proteína que une la vía extrínseca con la vía intrínseca es Bid, la Granzima B activa directamente a la pro-caspasa 3. Apaf 3, procaspasa 9: CTL, Linfocito T citotóxico; Bax, Bid, Bcl-2, Bcl-X_L, miembros de la familia Bcl-2, C, citocromo C; C3, C6, C7 y C10, caspasas activas; DIABLO, Proteínas de unión a IAP de bajo pl; IAP, proteínas inhibidoras de la apoptosis. Las señales de activación se muestran con (→) y las señales inhibitorias y el punto que inhibe con (⊥). (Hengartner 2000, Ventura y col. 1999)

4.2.2.2. Mecanismos de acción de los fármacos antineoplásicos.

Los fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer poseen diversos mecanismos de acción, debido a la variedad de blancos moleculares de éstos, por lo tanto las estructuras químicas son de lo más diversas.

- a) Agentes alquilantes: Estos compuestos marcaron el inicio de la quimioterapia contra el cáncer con el uso de las mostazas nitrogenadas. Las mostazas nitrogenadas reaccionan sobre los nucleófilos celulares y en el DNA principalmente sobre la posición 7 de la guanina y los agentes alquilantes bifuncionales causan una unión de tipo covalente entre las dos cadenas del DNA. Aunque estos fármacos no actúan sobre una fase específica del ciclo celular, se observa mayor sensibilidad al final de la fase G1 y en la fase S. Ejemplos de este tipo de fármacos son el clorambucil, busulfan y mitomicina C (Gringauz 1997, Chabner y col 1996).
- b) Antimetabolitos: Estos agentes interfieren con el metabolismo de purinas y pirimidinas causando una disminución en la reserva de nucleótidos, en este grupo se incluyen los análogos del folato, de aminoácidos, de purinas y pirimidinas que participan en la biosíntesis de las bases nitrogenadas del DNA. Actúan en la fase S del ciclo celular. Ejemplo de análogo del folato es el metotrexato, de las pirimidinas el 5-fluorouracilo, de las purinas la 6 mercaptopurina y de los aminoácidos la azaserina (Gringauz 1997, Chabner y col 1996)
- c) Inhibidores de las topoisomerasas I y II: Estos fármacos estabilizan la unión de un complejo de topoisomerasa I ó II con el DNA causando rupturas de una o las dos hebras dependiendo de la enzima que se trate. Estos inhibidores actúan en las fases S y G2. Ejemplos de inhibidores de la topoisomerasa I son la camptotecina y el topecan y de la topoisomerasa II el etoposido y el tenoposido. (Gringauz 1997, Chabner y col 1996).
- d) Antibióticos antitumorales: Proviene de microorganismos del genero *Streptomyces* y presentan la característica de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA de forma horizontal debido a fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas, esto causa la

inhibición de la síntesis de RNA y DNA además algunos presentan la propiedad de formar radicales libres de oxígeno que originan la ruptura de las cadenas de DNA. Ejemplos de este tipo de fármacos son la actinomicina D, la daunorrubicina y las bleomicinas A₂ y B₂ (Gringauz 1997, Chabner y col.1996)

- e) Inhibidores de la mitosis: Se incluyen en este grupo a los alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina, la podofitotoxina y el paclitaxel. A excepción del paclitaxel, estos compuestos se unen a la tubulina y evitan su polimerización deteniendo a las células en metafase (Gringauz 1997, Chabner y col.1996). El paclitaxel se discutirá más adelante.
- f) Agentes hormonales: Útiles en el tratamiento de cáncer dependiente de hormonas como el de mama, próstata y cérvix. Estos fármacos se unen al receptor de hormonas esteroides y promueven su migración al núcleo, de esta manera se vuelve antagónica la acción de estos compuestos. Algunas veces se utilizan andrógenos para contrarrestar los efectos de los estrógenos y viceversa. Ejemplos de este tipo de fármacos son el tamoxifen y la nafodixina. (Gringauz 1997, Chabner y col.1996)
- g) Otros: En este grupo se incluyen fármacos con diversos mecanismo de acción como el cisplatino que forma aductos con el DNA, la procarbazona que no posee un mecanismo de acción claro y la L-asparaginasa que hidroliza la asparagina (Gringauz 1997, Chabner y col.1996).

4.2.3 Paclitaxel.

El paclitaxel es un diterpeno aislado originalmente del árbol *Taxus brevifolia* con un rendimiento del 0.007 %, por ese motivo se prefirió la semisíntesis a partir de metabolitos secundarios de *Taxus baccata* Linnaeus y de *Taxus wallichiana* Zuccarini (Pezzuto 1996). La primera muestra pura de este compuesto se obtuvo en 1966 y la estructura se reportó en 1971 (fig. IV-4) (Suffnes y col. 1995).

El taxol está indicado en el cáncer de ovario, mama, de células no pequeñas de pulmón, de esófago, de vejiga, de endometrio, de cérvix, linfoma y sarcoma de Kaposi (Crowne y col. 2000, Pezzuto 1996).

Este fármaco es un inhibidor de la mitosis, y a diferencia de los alcaloides de la vinca causa la estabilización de los microtúbulos (Shiff y col. 1979), esta estabilidad se da por la unión del paclitaxel a la unidad β del dímero de tubulina y los aminoácidos β 1-31 y β 217-233 son importantes para la unión (Giannakakou y col. 2000)

Los efectos celulares del paclitaxel son dosis y tiempo dependientes y éstos son: inhibición de la proliferación, centrosomas mitóticos con arreglos de microtúbulos no asociados con el centrómero, incremento en la concentración de tubulina posiblemente por la inducción de la expresión de ésta, resistencia a la despolimerización y apoptosis (Schmitt y col. 1998, Valle 1995).

El paclitaxel causa que los microtúbulos no sean funcionales y sostiene un bloqueo entre la vecindad de las fases metafase y anafase de la mitosis (Rowinsky 1999).

Dentro de su farmacocinética se tiene que se une extensivamente a proteínas plasmáticas, su volumen de distribución es muy grande y su penetración al SNC es deficiente (Crown y col. 2000). Se administra por goteo intravenoso usando como vehículo Cremofóro EL (50 % etanol y 50% aceite de ricino polietóxilado) (Chabner y col. 1996). El paclitaxel es sustrato de la glicoproteína P, lo que explica la baja concentración en SNC y algunos casos de resistencia (Rowinsky 1999), pero se ha observado que el Cremofóro EL aumenta la sensibilidad de las células que expresan esta proteína a la acción del paclitaxel (Suffness y col. 1995).

Al administrar este fármaco se ha observado la fosforilación de la proteína Bcl-2 impidiendo de esta manera su efecto antiapoptótico (Haldar y col. 1995), esta fosforilación al parecer esta mediada por Raf-1, una serin/treonin cinasa que participa en señales de transducción. El paclitaxel puede modular la expresión de genes posiblemente a través del NF- κ B e inducir apoptosis, sin que sea necesaria la estabilización de microtúbulos, lo cual es inhibido por glucocorticoides (Huang y col. 2000).

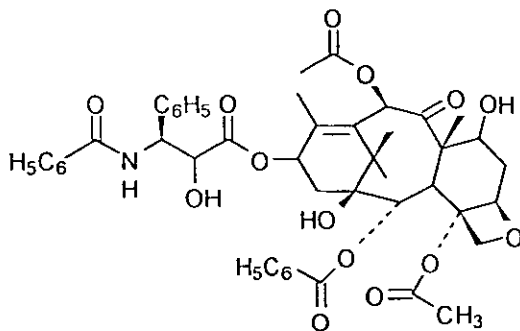


Fig. IV-4 Estructura química del paclitaxel. El paclitaxel consta de un anillo taxano como núcleo. Es una molécula poco soluble en agua y el primer estudio estructura actividad mostró que el núcleo taxano y la cadena C-13 son esenciales para su actividad (Suffness y col. 1995).

Los efectos adversos de este medicamento son varios e incluyen mielosupresión, neuropatía, encefalopatía, mialgia, fatiga, alopecia, diarrea y toxicidad de mucosas, piel y uñas (Crown y col. 2000, Rowinsky 1999). El paclitaxel además tiene propiedades similares a las endotoxinas que estimulan la síntesis de citocinas proinflamatorias y óxido nítrico en macrófagos.

4.2.4 Eptilonas.

La naturaleza ha proporcionado una amplia variedad de sustancias que mejoran la calidad de vida de los seres humanos, como ejemplo tenemos al ácido acetilsalicílico, la penicilina y fármacos antitumorales como el paclitaxel, vincristina y actinomicina D. Los productos naturales son la esperanza más prometedora para el tratamiento del cáncer (Pezzuto 1996).

El paclitaxel ha tenido un éxito clínico y comercial considerable (Cowden y col. 1997, Nicolau y col. 1998) y en los años noventa se vendió en más de 60 países en todo el mundo recaudando aproximadamente 813 millones de dólares solamente en 1996 (Nicolau y col. 1998). La búsqueda a nivel mundial de nuevos compuestos con un mecanismo de acción similar al Paclitaxel ha llevado al descubrimiento de nuevas moléculas (Cowden y col. 1997) como la eptilona A y B, la discodermolida obtenido de una esponja marina y eleuderobinas/sarcodictinas obtenidas de corales (Giannakakou y col. 2000). De

estos compuestos las epotilonas son estructuralmente las más sencillas, fueron aisladas a partir de cultivos de la mixobacteria *Sorangium cellulosum* cepa Soce90 recolectada de una muestra de tierra del río Zambesi en Africa del Sur por el Gesellschaft Für Biotechnologische Forschung de Alemania, demostrando actividad contra hongos, bacterias y líneas celulares tumorales animales (Nicolau y col. 1998).

En 1995 Bollag y col., del departamento de investigación de Merck aislaron de forma independiente ambas epotilonas a partir de *S. cellulosum* cepa SMP44, y demostraron *in vitro* su actividad de estabilizar microtúbulos a partir de dímeros de tubulina extraídos de cerebros bovinos. Utilizando células Rat-1 demostraron *in vivo* que los arreglos de microtúbulos eran idénticos a los que producía el paclitaxel, y esta estabilización en la polimerización de la tubulina era resistente al tratamiento con calcio y a temperaturas bajas. Normalmente los microtúbulos en presencia de calcio o bajas temperaturas se despolimerizan.

Al realizar estos investigadores estudios de competencia por el sitio de unión del paclitaxel, mostraron que ambas epotilonas se unen al mismo sitio de la tubulina al que se une el paclitaxel y en otros experimentos demostraron que las epotilonas causan un arresto en la fase G2/M del ciclo celular y muerte por apoptosis.

Una ventaja de las epotilonas sobre el paclitaxel es que las epotilonas no son sustratos para la glicoproteína P ya que las células KBV-1 y A2780Ad que presentan multirresistencia a fármacos son más sensibles a las epotilonas que al paclitaxel (Bollag y col. 1995, Ojiwa y col. 1999). Siendo la epotilona B más potente en un rango de 2000 a 5000 veces que el paclitaxel (Nicolau y col. 1998). Con respecto a su capacidad de estabilizar microtúbulos la epotilona B es más eficiente que la A y ambas más eficientes que el paclitaxel (Nicolau y col. 1998). Por otro lado las epotilonas son más hidrosolubles y se pueden obtener por fermentación de *Sorangium cellulosum* (Service 1996)

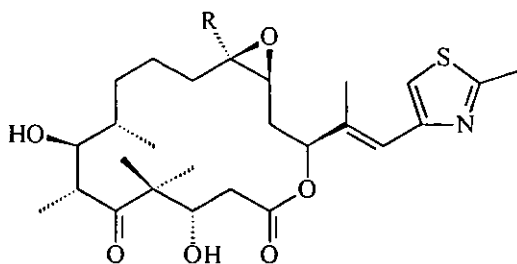
Las epotilonas son policétidos que incluyen una lactona macrocíclica de 16 átomos de carbono que posee siete centros ópticamente activos, una cadena tiazolada y un epóxido (Fig. IV-5) (Cowden y col. 1997), de hecho el nombre de

epotilona proviene de sus unidades estructurales epóxido, tiazol y cetona (Nicolau y col. 1998). Las epotilonas son análogos estructurales de macrólidos como la eritromicina, chalcemicina, carbomicina, rosamicina y rizocina (Nicolau y col. 1998, 87 Bollag y col. 1995),

4.2.5. Aril fosfatos

El fósforo dentro del organismo ocupa cerca del 1 % del peso corporal. El grupo fosfato u ortofosfato forma parte del contenido mineral de huesos y dientes como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ y forma parte de las bases nitrogenadas del DNA y RNA (Chang 1992).

El ion fosfato existe en una amplia variedad de estructuras resonantes equivalentes (Fig. IV-6) las cuales estabilizan notablemente al ión por resonancia, cuando el fosfato forma uniones éster no todas las estructuras resonantes son posibles por lo que la hidrólisis del grupo fosfato está termodinámicamente favorecida. El fosfato está implicado en almacenamiento de energía en la forma de ATP principalmente y en la regulación metabólica mediante fosforilación de proteínas específicas en residuos de serina, treonina o tirosina.



R=H: Epotilona A

R=Me: Epotilona B

Fig IV-5 Estructura química de las epotilonas A y B.

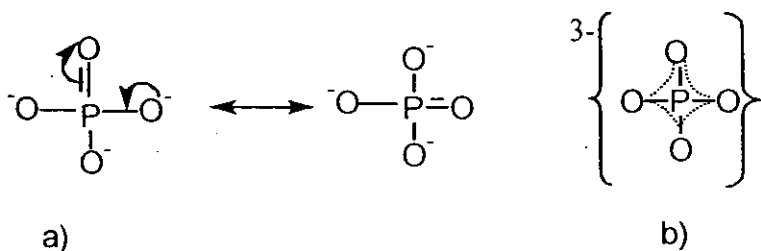


Fig. IV-6. Estructura del ion fosfato. a) El ion fosfato PO_4^{3-} puede tener hasta 4 estructuras de resonancia equivalentes por lo que en su estructura las tres cargas negativas están deslocalizadas y la forma más correcta de representar este ion es como se encuentra en b) esta deslocalización electrónica le confiere una geometría tetraédrica

Se ha observado que algunos tumores presentan un nivel de actividad de fosfatasas elevado, las fosfatasas ácidas se dividen en tres grupos dependiendo de su peso molecular, las de mayor peso son de 200 KDa ó 100 KDa aproximadamente y las de menor peso son de 35 KDa o menos. Las de alto peso molecular son lisosomales y se inhiben con tartrato y fluoruro mientras que las de bajo peso molecular son citoplasmáticas y no son inhibidas por tartrato o fluoruro. Las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular son activas sobre fosfotirosil proteínas (Zhang y col. 1990).

La actividad de las fosfatasas ácidas de bajo peso molecular se mide utilizando p-nitrofenilfosfato que al ser hidrolizado por las fosfatasas libera p-nitrofenol. El estudio de la especificidad de una fosfatasa ácida aislada de corazón de bovino indicó que este tipo de enzimas son específicas para hidrolizar arilmonofosfatos, tirosina monofosfato y monofosfato de flavina. De los aril monofosfatos el fosfato de fenilo y el 2-etilfenilfosfato son sustratos adecuados, mientras que el fosfato de bencilo no es reconocido por la enzima; los compuestos con más de tres átomos de carbono entre el fenil y el fosfato son sustratos moderados (Zhang y col. 1990).

La hidrólisis de los aril fosfatos genera alcoholes y en el caso del fosfato de fenilo se produce fenol. El fenol puro es un sólido incoloro o blanco de olor dulce y alquitranado, el fenol puede ser de origen natural o sintético. Su entrada al organismo puede ser a través de vía oral, aérea y/o cutánea y su eliminación es

por vía urinaria 24 h después de su entrada al organismo, el fenol también es producido de manera endógena en muy baja cantidad.

El fenol es antiséptico a bajas concentraciones, es anestésico y se usa en soluciones contra el dolor de garganta y en soluciones isotónicas que contienen fenol a muy bajas concentraciones inyectadas en nervios periféricos, disminuyen el dolor de algunos desórdenes nerviosos, tienen acción queratolítica y es auxiliar para eliminar manchas y verrugas de la piel y en la industria se utiliza en la producción de resinas fenólicas, caprolactam y bisfenol A por mencionar solo algunas sustancias además de ser usado como desinfectante . La International Agency for Research on Cancer ha colocado al fenol dentro de los compuestos no clasificables con respecto a la inducción de cáncer en humanos debido a que los datos epidemiológicos y los estudios en animales de laboratorio no son concluyentes (ATSDR 2001).

El fenol causa citotoxicidad por un mecanismo en el cual están involucrados radicales libres (Goldman y col. 1999, Hansch y col. 2000, Selassie y col. 1998), el cual lleva a la formación del radical fenoxilo que al oxidar otros substratos genera nuevamente fenol, por lo que su mecanismo de acción es cíclico (Goldman y col. 1999, Selassie y col. 1998). Estudios realizados en células de leucemia HL-60 mostraron que el fenol causa daño oxidativo en las células, lo cual se reflejó en la oxidación de tioles presentes en proteínas, oxidación de lípidos y formación de productos hidroxilados de la guanina. En este sistema la formación del radical fenoxilo fue mediada por la mieloperóxidasa ya que cuando se inhibía la síntesis de esta proteína, la capacidad del fenol para causar estrés oxidativo se disminuía considerablemente (Goldman y col. 1999). Otras peróxidasas, la prostaglandina sintetasa y la tirosinasa también están involucradas en la formación del radical fenoxilo (Selassie y col. 1998).

Los radicales libres se producen normalmente dentro de las células, por ejemplo los linfocitos y fibroblastos los producen en cantidades bajas, en donde actúan como reguladores del crecimiento. Forman parte de los mecanismos de defensa durante el estallido respiratorio de células fagocíticas. El óxido nítrico sintetizado dentro de células endoteliales a partir de la L-arginina es el activador

de la guanilato ciclasa que regula el tono vascular a través de cGMP; participan en el control y mecanismo de enzimas como la ribonucleótido difosfato reductasa, el citocromo P450, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa y además son productos de enzimas como la xantina oxidasa y la NAD(P)H oxidasa (Rice-Evans y col. 1993).

Durante la respiración oxidativa, donde el oxígeno es reducido a agua, se forma en muy baja proporción peróxido de hidrógeno y radical superóxido (Möller y col. 1996), pero en periodos de isquemia seguidos por reperfusión estas especies se producen en gran cantidad, el peróxido de hidrógeno y el superóxido son poco citotóxicos, pero su reactividad puede ser amplificada al reaccionar con iones de metales de transición, proteínas con grupo hemo y óxido nítrico. Por ejemplo los iones de hierro y cobre pueden catalizar la conversión de peróxido de hidrogeno y el superóxido al radical hidroxilo el cual es altamente reactivo (Rice-Evans y col. 1993).

El radical fenoxilo es una especie estable debido a que el radical formado en el oxígeno del hidroxilo puede ser estabilizado por resonancia en el anillo aromático, por otro lado el radical fenoxilo a diferencia de las especies reactivas de oxígeno es hidrofóbico lo que ayuda a su movimiento dentro de la célula por los sistemas de membranas (Hansch y col. 2000, Selassie y col. 1998).

Los radicales libres al interaccionar con lípidos insaturados forman radicales alquilo, los cuales toman oxígeno para generar radicales alquilperóxido que pueden reaccionar con lípidos adyacentes para formar reacciones en cadena de radicales libres, con proteínas de membrana o con otros radicales alquilperóxido (Rice-Evans y col. 1993).

Cuando los 1,3 dienos producidos durante la reacción en cadena de radicales libres reaccionan entre ellos forman polímeros de lípidos que están asociados con la pérdida de tono muscular y elasticidad de la piel con la edad. Durante esta serie de reacciones se puede formar malonaldehído, por la lisis de endoperóxidos, que al reaccionar con grupos amino de proteínas o ácidos nucleicos da como resultado productos entrelazados coloridos llamados lipofucsina, los cuales se incrementa con la edad en células nerviosas, cerebro y corazón (Scott 1995).

Los radicales libres pueden reaccionar con proteínas a través de los residuos de aminoácidos lo cual puede inducir cambios en la estructura secundaria o terciaria de la proteína o su destrucción (Rice-Evans y col. 1993).

El daño oxidativo al DNA implica daño a las bases nitrogenadas y la formación de 8-hidroxidesoxiguanina es un indicador de que este daño esta ocurriendo. Por otro lado, el daño al citoesqueleto puede alterar la expresión y transcripción genética, interacciones del mRNA con los ribosomas y la distribución de proteínas de membrana (Möller y col. 1996).

Como ya se mencionó el radical fenoxilo es estable, pero no se puede descartar que al llegar a un sitio susceptible pueda causar daño oxidativo. Se ha comprobado que este radical es muy reactivo contra grupos sulfhidrilo que eventualmente forman superóxido a partir de radicales tiol o disulfuro y de esta manera el radical fenoxilo es capaz de generar especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo al DNA o proteínas (Selassie y col. 1998). La oxidación casi selectiva de sulfhidrilos a disulfuros que presentan los fenoles puede afectar la actividad de enzimas como factores de transcripción, receptores y canales que se regulan por mecanismos redox y de particular interés son las caspasas las cuales pueden estar reguladas a través de cisteínas (Goldman y col. 1999).

Los estudios cuantitativos de la relación estructura actividad del fenol indican que la citotoxicidad de este compuesto depende de un balance entre la densidad electrónica del anillo aromático y la hidrofóbicidad; ya que grupos electroattractores estabilizan el radical y el fenol seria por lo tanto menos reactivo. Por otro lado grupos electrodonadores harían al radical fenoxilo inestable y reaccionaría solo con las biomoléculas cercanas (Selassie y col. 1998). La presencia de los sustituyentes del fenol por lo tanto son los que determinarán la facilidad de extraer un H[•] y la potencia reactiva del radical fenoxilo formado. La hidrofóbicidad está implicada en el movimiento del fenol dentro de la célula y en generar toxicidad no específica por la interacción de este compuesto con membranas (Hansch y col. 2000).

Una característica de una variedad de células con alto grado de división es la generación de cantidades elevadas de especies reactivas de oxígeno (Hansch y

col. 2000), además se ha reportado que el daño oxidativo dentro del tejido tumoral es mayor que el de los tejidos sanos. Los tumores están frecuentemente infiltrados por células inflamatorias que generan una cantidad significativa de especies reactivas de oxígeno aunado a que algunos tumores generan gran cantidad de peróxido de hidrógeno (Shacter y col. 2000). Estudios hechos con el 4-hidroxi-3-t-butilanisol demostraron que este compuesto posee mayor actividad citotóxica contra una línea celular de cáncer de glándulas salivales que contra una línea de fibroblastos gingivales normales de humano, y esta actividad puede ser atribuida a la capacidad de este compuesto de generar y destruir radicales libres (Sato y col. 1999).

4.3. Descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos.

Los primeros trabajos sobre fármacos citotóxicos fueron los de Goodman y col. para el tratamiento de leucemia con mostazas nitrogenadas en 1946, el uso de la aminopterina en 1948 y el de la 6-mercaptopurina en 1953. Durante los primeros años de la década de los cincuenta en E.U. se realizaba el ensayo de citotoxicidad de nuevos compuestos en el Sloan-Kettering Institute for Cancer Research pero debido a su capacidad limitada se creó en 1955 el National Cancer Institute (NCI) (Suffness y col. 1995).

El NCI ha probado miles de compuestos y extractos desde su creación (Boyd 1989), en los primeros años del NCI se utilizaron como modelo para identificar compuestos contra el cáncer ratones que desarrollaban neoplasias de tres tipos: leucemia, sarcoma y carcinoma (Trisha 1997). Estos modelos fueron desechados porque los compuestos activos que se encontraban al ser probados en pacientes humanos con cáncer no funcionaban de la misma forma que en los ratones (Trisha 1997).

En el periodo de 1975 a 1985 se cambio el esquema y se iniciaba la selección con ratones injertados con la línea celular de leucemia murina P388 y los compuestos activos pasaban a una segunda etapa donde eran confrontados contra un grupo de 4 a 8 líneas celulares animales y humanas heteroinjertadas en ratones desnudos, pero los compuestos identificados como activos solo lo eran contra leucemia y muy pocos contra tumores sólidos (Boyd 1989, Trisha 1997, Weinstein y col. 1997). En un estudio del NCI donde se probaron 12 fármacos antineoplásicos que se utilizaban en el tratamiento del cáncer contra 48 líneas celulares humanas injertadas en ratones no mostraron un efecto citotóxico apreciable, por lo que se concluyó que los estudios a través de este método podrían estar perdiendo compuestos activos (Trisha 1997).

Para evitar que los compuestos solo fueran activos contra leucemia se tomó la decisión de aumentar el número de células utilizadas en la primera parte del ensayo y éstas además debían ser de diferente origen, pero realizar este ensayo *in vivo* era costoso y poco práctico (Boyd 1989).

Por las razones anteriores en 1985 se estableció un método *in vitro* para la realización de la selección primaria de nuevos compuestos en un panel de 60 líneas celulares humanas y se partió de la hipótesis de que un compuesto que fuera activo contra una línea celular específica podría predecir la eficacia de este compuesto contra el cáncer del mismo origen (Weinstein y col. 1997). El panel incluye líneas de diversas partes del organismo como son pulmón, colon, melanoma, riñón, ovario, sistema nervioso central, leucemia y mama (Alley y col. 1988, Weinstein y col. 1997), las cuales fueron evaluadas en su velocidad de crecimiento además de analizadas por métodos enzimáticos y microbiológicos (Alley y col. 1988).

Los ensayos con líneas celulares están arrojando gran cantidad de compuestos con actividad citotóxica (Trisha 1997) que proveen información valiosa sobre los mecanismos moleculares. Además al contar con una base de datos que se enriquece con cada nuevo compuesto descubierto se puede buscar un patrón estructural y mecanístico del compuesto, lo que brinda la posibilidad de crear grupos farmacofóricos y mecanismos de acción nuevos. A través de este programa se reduce considerablemente la cantidad de compuestos que pueden ser llevados a fases clínicas (Weinstein y col. 1997). En la fig. IV-7 se muestra el esquema de desarrollo de la fase preclínica actual.

Aunque el uso de líneas celulares es ventajoso por la sencillez técnica que presenta, los compuestos que han llegado al uso clínico con esta metodología aún son muy pocos para juzgar la capacidad predictiva de este modelo (Boyd 1989).

Los compuestos probados se obtienen de bibliotecas químicas de compuestos sintetizados o semisintetizados en laboratorios farmacéuticos, universidades e institutos de investigación. Estos compuestos son de bajo peso molecular por lo general, y se obtienen además de fuentes naturales principalmente de hongos con una pequeña contribución de actinomicetos y plantas (Bevan y col. 1995). El tamizaje convencional se puede aplicar sin información estructural previa por lo que puede llegar a ser empírico, además se puede aplicar a cualquier molécula y blanco molecular por lo que el grado de éxito es aceptable. Por otro lado está el diseño racional donde la especificidad del

fármaco se diseña previamente en base a conocimientos estructurales previos, lo cual está limitado por los programas de computo y como el tipo de ensayo para estos compuestos se basa en restaurar o eliminar un blanco molecular específico el éxito es muy limitado (Bevan y col. 1995).

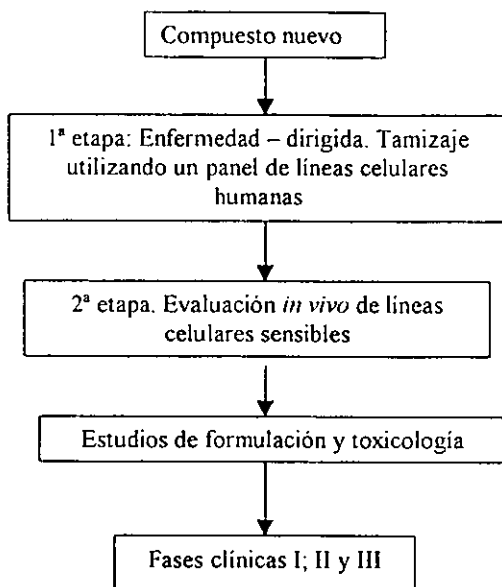


Fig IV-7 Fases del desarrollo preclínico de un compuesto citotóxico

Adicionalmente los métodos de selección de los compuestos citotóxicos están modificándose para encontrar moléculas que ataquen o corrijan un blanco molecular determinado. Un ejemplo de esto es obtener compuestos para estabilizar los microtúbulos mediante el ensayo creado por Bollag y col., a través de este método el investigador puede probar más de 300 muestras al día. O compuestos que restauren la función de p53 tal y como lo hicieron Foster y col. en el centro de investigación de Pfizer, ellos idearon un método de identificar compuestos que restauraran la función y conformación de p53 mutante mediante el uso de anticuerpos, con este método probaron cerca de 100,000 compuestos, y

de los compuestos que restauraban la función y conformación de p53 se encontró que también eran antitumorales *in vivo*.

De trabajos como los anteriores se observa la necesidad de hacer selección de compuestos a gran escala y que esta selección se base en un blanco molecular, es decir, se da prioridad al descubrimiento de nuevos blancos moleculares y compuestos que actúen a este nivel que encontrar compuestos nuevos de mecanismo desconocido.

4.3.1. Métodos para medir la viabilidad celular.

Los métodos para medir la viabilidad son diversos y pueden ser rápidos, generalmente basados en la integridad de la membrana celular por exclusión o captura de colorantes (exclusión de azul de tripano, eritrosina; captura de diacetilfluoresceína) o por captura y retención de iones radiactivos ($^{51}\text{Cr}^{3+}$) (Freshney 1994b).

Los ensayos que se utilizan para medir la viabilidad después de la exposición de células a un compuesto citotóxico no pueden estar basados en la integridad de la membrana porque estos ensayos se realizan a tiempos donde las células muertas podrían haber desaparecido por ruptura. En su lugar se utilizan ensayos, que son indirectos y se clasifican en dos tipos: los metabólicos y los de sobrevivencia (Freshney 1994b).

Los ensayos metabólicos miden la capacidad de la célula de seguir realizando síntesis de DNA (que se puede medir utilizando timidina- ^3H), de proteínas (por el método colorimétrico de la sulforrodamina B o utilizando aminoácidos radiactivos) o midiendo la capacidad de realizar respiración aeróbica (ensayo del MTT); los ensayos de sobrevivencia miden la capacidad de la célula de seguir proliferando después del tratamiento (ensayo clonogénico) (Freshney 1994b).

Estos ensayos *in vitro* presentan limitaciones debido a que la toxicidad que se mide es solo un evento celular y puede ser sobrestimada y solo pueden ser extrapolados con precaución a situaciones *in vivo*. El ensayo clonogénico que se consideraba como estándar cuando se realizó un estudio con células p21^{-/-} y

p21^{+/+} las cuales se irradiaron *in vitro* no mostró diferencias en sensibilidad, pero al realizar el mismo tratamiento *in vivo* se observó que las células p21^{+/+} formaban tumores y las células p21^{-/-} mostraban una regresión significativa del tamaño de los tumores(Waldman y col. 1997).

De lo anterior se concluyó que el ensayo clonogénico falló en predecir la utilidad de la radiación en los animales que poseían el tumor y se demostró que este ensayo no es infalible, pero eso no significa que el ensayo no es eficaz sino que es útil en ciertas condiciones (Waldman y col. 1997) lo cual podría ser el caso para todos los métodos utilizados para medir la viabilidad celular.

4.3.2 Técnica del MTT.

La técnica del MTT es una de las más utilizadas y provee una forma rápida y fácil de medir la viabilidad celular (Carmichael y col. 1987) y se basa en la capacidad de las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua y de color amarillo a un compuesto insoluble en agua y de color púrpura (formazán del MTT), de este modo la reducción del MTT es directamente proporcional a la cantidad de células viables(Alley y col. 1988, Plumb y col. 1989).

Utilizando homogeneizados de hígado de rata se encontró que la reducción del MTT se lleva a cabo en la cadena respiratoria al nivel de la ubiquinona y los citocromos b y c, aunque no hay suficiente evidencia para afirmar que el único sitio de reducción es la mitocondria porque el MTT también acepta electrones de substratos reducidos y coenzimas como el NADH y NADPH (Vistica y col. 1991).

La técnica se utiliza principalmente para medir la viabilidad celular después de un tiempo de exposición a un compuesto con posible actividad citotóxica, para esto se agrega un número de células apropiado en placas de cultivo y cuando se alcanza la fase de crecimiento exponencial, se agrega el compuesto a las células. Al adicionar el MTT se deben incubar las placas por lo menos cuatro horas para que la reducción del MTT se realice de forma proporcional al número de células viables.

El formazán formado se extrae de las células utilizando DMSO y se lee la absorbancia a 540-570 nm. Aunque los solventes que se utilizan para disolver el formazan son varios (HCl en isopropanol 0.4 N, dimetilformamida, hexano, propilenglicol y DMSO), el DMSO es el más conveniente para el ensayo ya que la extracción del formazan de las células es rápida, debido a que no se necesita un método de lisis, la solución además es estable por más tiempo y la absorbancia obtenida con este disolvente es adecuada (Alley y col. 1988).

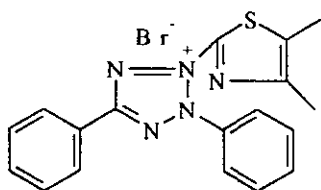


Figura IV-8 . Estructura química del bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

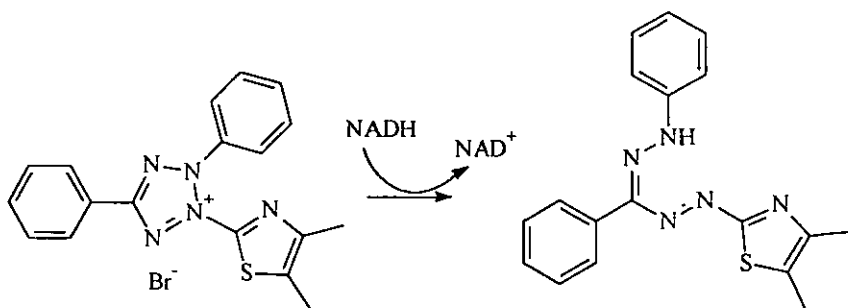


Fig IV-9 Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo tetrazolio el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria (Plumb y col. 1989).

En el presente trabajo se evaluó la actividad citotóxica de dos compuestos relacionados con la epotilona, cuatro aril-fosfatos y un derivado del fenol en líneas celulares tumorales humanas y una de hámster (HeLa, C-33, Calo, SW620, SW480, CHO y MCF-7). La técnica para medir la viabilidad celular fue la técnica del MTT. Todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de un control negativo, un control de disolvente para cada experimento y un control positivo utilizando paclitaxel.

V. Metodología.

5.1. Mantenimiento de líneas celulares.

Todos los procedimientos se realizan dentro de una campana de flujo laminar. El material utilizado en la manipulación de medio de cultivo o líneas celulares debe ser estéril y limpio.

5.1.1 Descongelación de las líneas celulares.

- a) Se prepara el medio de cultivo D-MEM y se lleva a 37 °C aproximadamente. Se colocan 3.5 mL en una caja Petri de 5 cm previamente rotulada.
- b) Se saca el criotubo del N₂L que contiene las células con las que se va a trabajar y se descongela el contenido con agua tibia o con la mano.
- c) Se agrega el contenido del criotubo en la caja Petri y se distribuye el contenido con movimientos circulares suaves.
- d) Se incuba a 37 °C, 5 % de CO₂ por dos horas o hasta que las células se adhieran a la superficie de la caja Petri y se cambia el medio de cultivo por medio fresco.

5.1.2 Propagación de la línea celular.

5.1.2.1 Se observa el cultivo celular en un microscopio invertido, si el nivel de confluencia es escaso y se observa detritus

- a) Se aplican movimientos circulares suaves a la caja y el medio de cultivo se decanta o se succiona con ayuda de una pipeta Pasteur
- b) Posteriormente se lava con PBS-EDTA y se decanta o succiona con una pipeta Pasteur. Se repite si se considera necesario.
- c) Se adiciona medio de cultivo fresco atemperado y se incuba a 37 °C, 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda

5.1.2.2. Si al observarse el cultivo celular la confluencia es elevada y la línea celular se va a propagar se llevan los pasos a) y b) de 1.2.1.

- a) Se adiciona PBS-EDTA para cubrir la monocapa celular y se incuba a 37 °C por 5 ó 10 minutos

- b) Concluido el tiempo de incubación se desprenden las células con ayuda de una pipeta Pasteur vertiendo el PBS-EDTA hasta observar que se torna turbio el PBS-EDTA
- c) Se disgregan las células desprendidas succionando y expulsando suavemente el PBS-EDTA hasta obtener células individuales, lo cual se comprueba observando al microscopio.
- d) Se adiciona una alícuota de la suspensión celular en una caja Petri que contiene medio de cultivo y se distribuyen las células uniformemente por medio de movimientos circulares.
- e) Se deja que las células sedimenten aproximadamente 10 minutos en una superficie horizontal y se incuba a 37 °C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda

5.1.3 Criopreservación de líneas celulares.

La línea de cultivo que se requiera congelar debe poseer una confluencia alta, se realiza los pasos a)-b) de la sección 5.1.2.1 y los pasos a)-d) de la sección 5.1.2.2.

- a) La suspensión celular se colecta con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de centrifuga. Se centrifuga la suspensión celular a 2000 r.p.m. durante 5 minutos.
- b) Obtenido el botón celular se decanta el PBS-EDTA y se resuspende el botón celular con el PBS-EDTA residual dando golpes suaves al tubo.
- c) Se adicionan 4.5 mL de medio de congelamiento (Sección 5.3.5) por cada caja de cultivo cosechada y se homogeniza con pipeta Pasteur para lograr una suspensión celular uniforme, se alícuota la suspensión en criotubos.
- d) Se congelan los criotubos en posición vertical a - 70 ° C por 2-4 horas.
- e) Se introducen los criotubos en nitrógeno líquido

5.2. Análisis de citotoxicidad.

5.2.1. Exposición al fármaco.

Todos los procedimientos se realizan dentro de la campana de flujo laminar excepto el conteo celular. Todo el material utilizado en la manipulación de medio

de cultivo y líneas celulares debe ser estéril y limpio. Se debe contar con un cultivo celular de confluencia alta (> 80%), el cual se estabilizó manteniéndolo durante una semana y se realiza el siguiente procedimiento:

- a) Se atempera el medio de cultivo y el PBS-EDTA
- b) Se decanta el medio de cultivo de la(s) caja(s) Petri que contiene(n) la línea celular.
- c) Se agrega PBS-EDTA para lavar las células y se decanta. El procedimiento se repite dos veces más.
- d) Se agrega PBS-EDTA suficiente para cubrir las células y alcanzar 2-4 mm de altura aproximadamente en la(s) caja(s) Petri y se incuban por 10 a 15 minutos a 37 ° C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda.
- e) Con una pipeta Pasteur se resuspende el PBS-EDTA para desprender las células que se encuentran adheridas, lo cual se comprueba por la aparición de turbidez. Seguir resuspendiendo hasta que la suspensión sea homogénea y las células se encuentren disgregadas de forma individual (aproximadamente 15 a 20 veces son suficientes para tener células individuales en la suspensión).
- f) Se realizan las diluciones pertinentes con medio de cultivo, homogenizando la suspensión celular y se cuentan en la cámara de Newbauer.
- g) Se agregan de 5000 a 8000 células por pozo en una placa de cultivo de 96 pozos utilizando un volumen de suspensión celular de 30 a 50 µL por pozo.
- h) Se agrega medio de cultivo c. b. p. 230 µL, rotular la placa e incubar a 37 ° C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda por 24 horas.
- i) Al término de la incubación se agrega el fármaco el cual se diluyo con medio de cultivo sin complementar o PBS de tal manera que se agreguen 20 µL por pozo para completar 250 µL por pozo y se obtenga la concentración aproximada con la que se va a exponer a las células (20-120 µM).
- j) Se homogeniza la concentración del compuesto agitando en un agitador a 200 r.p.m. por 5 minutos.
- k) Se incuban por 48 horas a 37 ° C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda.
- l) Al finalizar la incubación se mide la viabilidad por la técnica del MTT.

5.2.2. Técnica del MTT.

- a) La placa de cultivo se invierte rápidamente y se remueve el medio de cultivo que contiene fármaco, con esta técnica se ha observado que se pierde menor cantidad de células que por aspirado.
- b) Se adicionan 230 μL de medio de cultivo fresco atemperado por pozo y se agregan 20 μL de solución de MTT a una concentración de 5 mg/ mL.
- c) Se incuban las células en contacto con la solución de MTT por un mínimo de 4 horas. La reducción se llevó a cabo cuando se observa que el medio de cultivo se torna rojo oscuro.
- d) Se remueve el medio con MTT invirtiendo la placa y dando un golpe rápido.
- e) Se extraen los cristales de formazan del MTT contenidos dentro de las células con 250 μL de DMSO pipeteando para lograr una disolución homogénea.
- f) Se leen las placas en un lector de Elisa con filtro de referencia de 630 nm y filtro de prueba de 490 nm. El porcentaje de células vivas se calcula con respecto a un control negativo utilizando la siguiente fórmula

$$\%inhibición = 100 * \left(1 - \frac{Absmuestra}{Abscontrol} \right)$$

5.2.3. Conteo celular en la cámara de Neubauer.

- a) La cámara de Neubauer se limpia con etanol al 70 %, se seca y se coloca en una superficie horizontal.
- b) Se toma una alícuota de la suspensión celular (aproximadamente 25 μL) y se coloca en la cámara de Neubauer.
- c) Se deja reposar unos minutos para que las células sedimenten (no más de 5 min. para evitar que la muestra se seque).
- d) Se coloca sobre el microscopio la cámara de Neubauer y se cuentan las células que se encuentran en los 8 cuadrantes correspondientes a la cuenta de linfocitos siguiendo el siguiente criterio:

De los 16 cuadros que comprenden cada cuadrante se tomara para contar en cada cuadro las células que estén dentro de él y si hay células que se encuentren en los límites se toman dos lados de tal forma que formen una "L" invertida. Las células que se encuentren entre estos lados solamente se adicionan al cuadro que se estaba contando, esto es con el fin de evitar que una célula se tome en cuenta para dos cuadros o más.

e) Cuando se obtenga el promedio de las ocho cuadrículas se aplica la siguiente formula

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \text{promedio} * 10^4$$

Al obtener el número de células por mL se puede calcular el volumen de suspensión adecuado para agregar en cada pozo y realizar el ensayo de citotoxicidad.

5.3 Soluciones

5.3.1. Solución de MTT

MTT (Sigma)	50 mg.
PBS-EDTA	10 mL

- Se pesa el MTT utilizando guantes debido a la toxicidad del compuesto.
- Se disuelve el MTT en PBS utilizando un tubo Falcon como contenedor. Se esteriliza por filtración usando membrana Millipore de 0.22 µM.
- Se cubre el tubo con papel aluminio y se conserva en refrigeración.
- La solución es estable durante un mes, después de este tiempo no se recomienda utilizar la solución.

5.3.2. Medio de cultivo

Medio D-MEM (Gibco)	un sobre
Antibiótico –antimicótico*(Gibco)	10 mL
HEPES (Sigma)	2.2 g

L - Piruvato (Gibco)	10 mL
NaHCO ₃ (Sigma)	3.7 g
Agua desionizada	c.b.p 900 mL
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	100 mL

- Se disuelve el sobre de medio de cultivo en 700 mL de agua al igual que los complementos usando un agitador magnético.
- Se agrega agua desionizada para completar 900 mL.
- Se esteriliza el medio por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 µm.
- Se coloca una alícuota del medio de cultivo en una caja Petri estéril y se incuba a 37 °C como control de esterilidad.
- Se alícuota el medio de cultivo en botellas de vidrio estériles y se refrigera para conservarlo.
- Antes de usarse el medio se complementa con 10 % de suero fetal bovino inactivado, el sobrante se conserva en refrigeración.
- El medio complementado no debe usarse después de 30 días.

*10,000 unidades por mL que contienen Penicilina G sódica 10,000 µg por mL, Sulfato de estreptomicina 25 µg por mL y anfotericina B como Fungizone® en solución salina al 0.85 %.

5.3.3. PBS-EDTA.

NaCl (J. T. Baker)	8.0 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1.44 g
KCl (J. T. Baker)	0.2 g
EDTA disodico (Sigma)	0.372 g
Agua desionizada	c.b.p. 1000 mL.

- Se disuelven las sales una por una (no importa el orden) en 900 mL de agua desionizada.

- Se afora a un litro utilizando un matraz volumétrico y se homogeneiza la solución.
- Se ajusta el pH con NaOH o HCl diluido hasta 7.4
- Se esteriliza en autoclave y se puede conservar a temperatura ambiente o en refrigeración.

5.3.4. PBS.

NaCl (J. T. Baker)	8.0 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma)	0.24 g
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1.44 g
KCl (J. T. Baker)	0.2 g
Agua destilada	c.b.p. 1000 mL

- Se procede igual que para el PBS-EDTA.

5.3.5. Medio de congelamiento.

Medio de cultivo	80 mL
Suero fetal bovino inactivado (Gibco)	20 mL
Glicerol estéril (Merck)	17.5 mL

- Se mezclan todos los ingredientes en un matraz estéril hasta que la disolución sea homogénea.
- Se alcuota en recipientes estériles y se conserva en congelación a -20 °C.
- Al momento de utilizarse se descongela y se toma la cantidad que se utilizara y el sobrante se puede congelar nuevamente

5.3.6. Aril-fosfatos (Fig V-1).

Se pesaron las siguientes cantidades de cada compuesto

F1	12.0 mg
F2	11.9 mg
F3	10.8 mg
F4	9.2 mg

Se disolvieron en 500 μ L de DMSO. Las soluciones tienen una concentración 75 mM de las cuales se partía para realizar diluciones con medio de cultivo sin complementar. Se conservaron las soluciones en congelación a -20°C .

5.3.7 Derivados de epotilona (Fig. V-1).

Se pesaron las siguientes cantidades de cada compuesto

E1 8.6 mg

E2 5.4 mg

Se disolvieron con 50 μ L de DMSO para obtener soluciones 0.6 M de cada compuesto, de las cuales se partía para realizar diluciones con PBS. Las soluciones se mantenían en congelación a -20°C .

5.3.8 Metol (Fig. V-1)

Se pesaron 17.2 mg de metol y se disolvieron en 0.5 mL de PBS. La solución obtenida es 0.2 M de la cual se partía para realizar las diluciones con medio de cultivo sin complementar. La solución se cubrió con papel aluminio y se mantuvo en congelación a -70°C .

5.4 Líneas celulares.

Las líneas celulares utilizadas fueron las siguientes:

- HeLa: Esta línea celular proviene del adenocarcinoma de cérvix de una mujer negra de 31 años de edad. Crece de forma adherente y posee la secuencia para el virus de papiloma humano 18
- SW480: Esta línea celular proviene de adenocarcinoma colorrectal y fue aislada por A. Leibovitz. Es tumorigenica en ratones desnudos y produce el antígeno carcinoembrionario. Su morfología es epitelial
- SW620: Esta línea celular fue aislada por A. Leibovitz y proviene de una metástasis de adenocarcinoma colorrectal que se encontraba en un nódulo linfático, es tumorigenica y expresa el antígeno carcinoembrionario.
- C-33: Línea proveniente de adenocarcinoma de cérvix obtenido de una persona caucásica de 66 años. Esta línea forma tumores en ratones desnudos

- Calo: Línea de cérvix humano que posee la información del virus del papiloma humano 18
- MCF-7: Línea aislada de un adenocarcinoma de glándula mamaria que expresa el receptor a estrógenos. Proviene de una mujer caucásica de 69 años
- CHO: Línea celular proveniente de una biopsia de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*). (ATCC 1992).

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado.

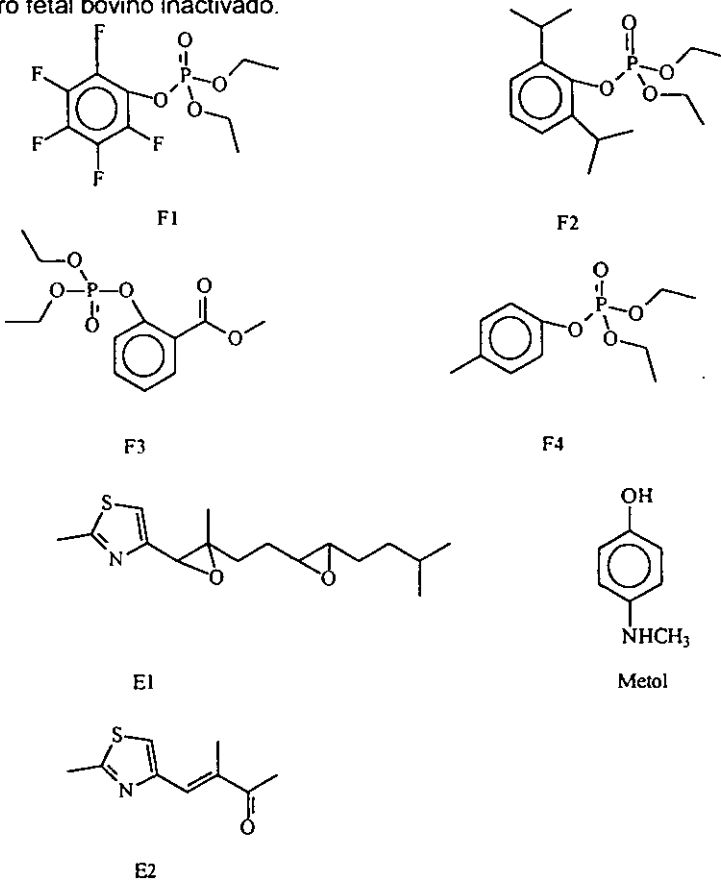


Figura V-1 Estructuras de los compuestos utilizados. F1-F4 Aril-fosfatos, E1 y E2 compuestos relacionados con la epotilona y metol.

VI. Resultados.

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se contó con una serie de cuatro aril-fosfatos, dos compuestos relacionados con la epotilona y un compuesto fenólico denominado metol (Fig. V-1). Estos compuestos se probaron en las líneas celulares tumorales de mamífero SW620, SW480 de cáncer colorrectal humano; las líneas celulares C-33, Calo y HeLa de cáncer de cérvix humano, la línea celular MCF-7 de cáncer de mama humana y la línea celular CHO de ovario de hámster.

En los experimentos llevados a cabo se utilizaron placas de 96 pozos a las cuales se les agregó el inóculo de células y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda por 24 h, tiempo suficiente para alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Después de este tiempo de incubación se agregaron los compuestos y se incubaron las células por 48 h, se eliminó el medio con el compuesto y se determinó la viabilidad celular por la técnica del MTT. Como control positivo se usó paclitaxel a una concentración de 0.25 µM y como control negativo se utilizaron células incubadas en ausencia de los fármacos.

Las soluciones de los aril-fosfatos y los compuestos relacionados con la epotilona se realizaron con DMSO y para el metol con PBS. Resultados previos del laboratorio demuestran que el DMSO tiene un efecto inhibitorio sobre las líneas celulares utilizadas, por lo que la cantidad máxima de DMSO que se podía agregar era de 1 µL por pozo, para descartar que el efecto inhibitorio sea debido al DMSO se realizó un control de disolvente, el control de disolvente se realizó utilizando la mayor cantidad de DMSO utilizado para realizar las soluciones que se ocuparon para agregar los compuestos a probar.

Los aril-fosfatos se probaron a concentraciones de 20 y 40 µM en todas las líneas celulares y los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI-1

Tabla VI-1 Efecto citotóxico de aril-fosfatos sobre las líneas celulares indicadas

Línea celular	Taxol 0.25 μ M	Control Disolvente	F1	F2	F3	F4
HeLa	53.93 \pm 2.997	-0.81 \pm 5.57	0.33 \pm 5.9	-4.38 \pm 5.97	-13.71 \pm 5.06	4.81 \pm 7.95
	46.84\pm1.41	0.19\pm8.95	7.89\pm6.90	-8.83\pm1.34	1.42\pm1.74	4.77\pm0.81
C-33	31.28 \pm 1.38	4.65 \pm 2.36	4.11 \pm 7.95	-2.32 \pm 4.63	-2.77 \pm 3.41	4.65 \pm 3.43
	30.05 \pm 2.41	2.45 \pm 4.48	-1.04 \pm 3.75	3.78 \pm 12.71	2.46 \pm 8.53	5.39 \pm 2.64
Calo	52.7 \pm 6.06	-2.7 \pm 2.99	13.37 \pm 6.95	9.01 \pm 6.73	2.96 \pm 4.41	5.62 \pm 4.31
	51.2\pm5.3	3.03\pm2.3	12.04\pm2.3	-1.12\pm4.3	-5.07\pm2.28	5.23\pm 5.00
SW620	30.29 \pm 4.47	-1.64 \pm 0.72	10.62 \pm 11.17	2.924.34	5.42 \pm 4.21	2.32 \pm 1.84
	35.68\pm2.98	1.4\pm2.1	16.25\pm10.13	11.75\pm7.16	4.43\pm3.18	9.01\pm0.01
SW480	37.13 \pm 4.71	-0.81 \pm 1.38	9.75 \pm 14.27	11.15 \pm 9.05	3.87 \pm 3.7	13.86 \pm 3.9
	33.81\pm6.339	4.24\pm1.08	3.21\pm1.26	12.14\pm5.92	8.3\pm6.77	12.52\pm4.17
MCF-7	57.53 \pm 3.04	2.48 \pm 1.29	9.74 \pm 4.04	6.45 \pm 9.36	10.38 \pm 11.29	5.58 \pm 6.10
	51.03\pm4.35	4.69\pm0.84	1.71\pm3.39	7.14\pm3.10	4.68\pm3.57	3.18\pm5.67
CHO	41.82 \pm 0.57	-0.1 \pm 2.48	1.03 \pm 1.29	-1.13 \pm 2.92	3.38 \pm 2.26	2.81 \pm 2.96
	43.22\pm2.89	4.5\pm3.94	8.5\pm1.07	5.1\pm5.09	10.84\pm7.43	2.59\pm8.55

Se probó la actividad citotóxica de los compuestos F1, F2, F3 y F4 a 20 μ m en *itálica* y a 40 μ m en *negrita*. El resultado es el % de inhibición de tres experimentos independientes

Los aril-fosfatos a 20 y 40 μM no presentaron actividad citotóxica (Tabla VI-1) pero para descartar si estos compuestos no poseían actividad a dosis mayores se probaron solamente en la línea celular HeLa en función de las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80, 100 y 120 μM . El compuesto F1 incrementa su valor de citotoxicidad a partir de 20 μM y alcanza una fase de meseta a partir de 60 μM con valores de inhibición que oscilan entre 28.1 y 24.62 %. (Fig. VI-1).

El compuesto F4 permanece sin presentar actividad citotóxica hasta la concentración de 80 μM , pero a 100 μM incrementa la viabilidad a 16.44 % y a 120 μM la incrementa a 29.3 % (Fig. VI-1)

Los compuestos relacionados con la epotilona se probaron a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 μM en todas las líneas celulares y los resultados se muestran en las figuras VI-2 y VI-3. En las gráficas se muestra que los compuestos no presentaron actividad citotóxica apreciable en ninguna de las líneas celulares utilizadas.

El compuesto metol el cual se probó a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 μM en todas las líneas celulares, presentó actividad citotóxica apreciable en todas las líneas celulares. (Fig. VI-4, Tabla VI-2). La línea celular MCF-7 fue la más sensible, mientras que la más resistente fue la línea celular Calo. En el caso de las líneas celulares HeLa, C-33, MCF-7, CHO y SW480 se mostró un porcentaje de inhibición máximo de 81 a 87 % aproximadamente y para la línea SW620 la inhibición máxima fue de 75.78 ± 4.05 % a 120 μM . Calo presentó inhibición de 69.95 ± 7.19 % a 120 μM (Fig. VI-4).

La línea celular HeLa con el compuesto metol presentó inhibición del crecimiento celular dosis dependiente hasta 80 μM , después de esa concentración no se observó aumento en la actividad citotóxica siendo el máximo alcanzado de 86.22 % de inhibición a 120 μM (Tabla VI-2)..

De las líneas celulares de cáncer de colon se encontró que SW480 fue más sensible que SW620. Para SW480 la concentración a la cual se alcanzó el efecto máximo fue a 60 μM , mientras que para SW620 fue a 100 μM . Los resultados obtenidos en estos dos casos fueron para SW480 a la concentración de 60 μM la

inhibición fue de 84.07 % mientras que para SW620 a 100 μM fue de 70.96 % (Fig. VI-4 Tabla VI-2).

La línea celular de cérvix C-33 y la línea celular de ovario de hámster CHO mostraron curvas dosis respuesta similares y la concentración necesaria para alcanzar el óptimo fue de 60 μM para ambas líneas. La inhibición máxima a la que llega cada línea es un poco diferente ya que para C-33 está entre 81 y 82 % y para CHO se encuentra entre 86 y 87 %. (Fig. VI-4, Tabla VI-2)

La línea celular de mama MCF-7, fue la más sensible y alcanzó la máxima inhibición a 40 μM la cual fue de 80.27 %, pero a 20 μM ya presentaba una inhibición de 70.22 % (Fig. VI-4, Tabla VI-2).

Calo (línea de cáncer de cérvix) fue la más resistente al metol y a 20 μM solo presentó una inhibición de 3.7 %, la inhibición fue aumentando con la concentración, y a 120 μM se alcanzó una inhibición de 69.95 %. Al parecer por los datos experimentales la curva estaba entrando ya en fase de meseta pues a 100 μM se obtuvo una inhibición de 65.04 %, la diferencia entre estas dos concentraciones en cuanto a la inhibición fue pequeña (Fig. VI-4).

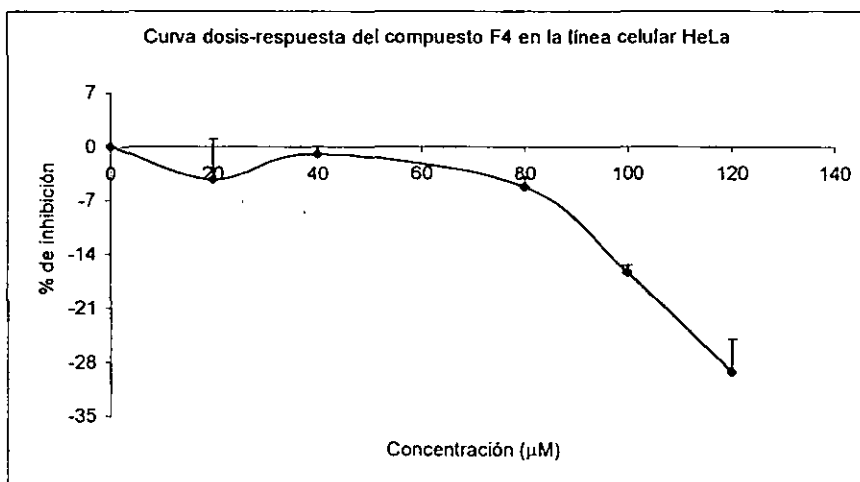
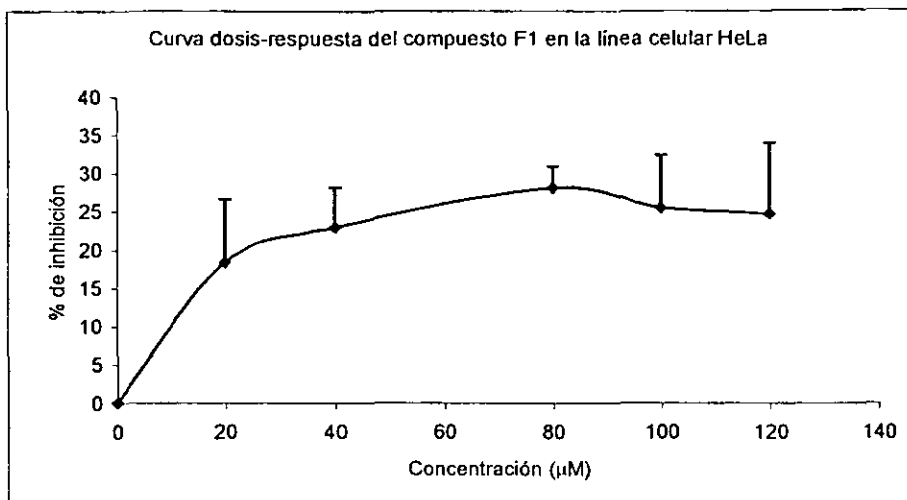


Fig. VI-1 Actividad citotóxica de los compuestos F1 y F4. Los compuestos F1 y F4 se probaron sobre la línea celular HeLa, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología 5.2. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes los cuales se hicieron por cuadruplicado

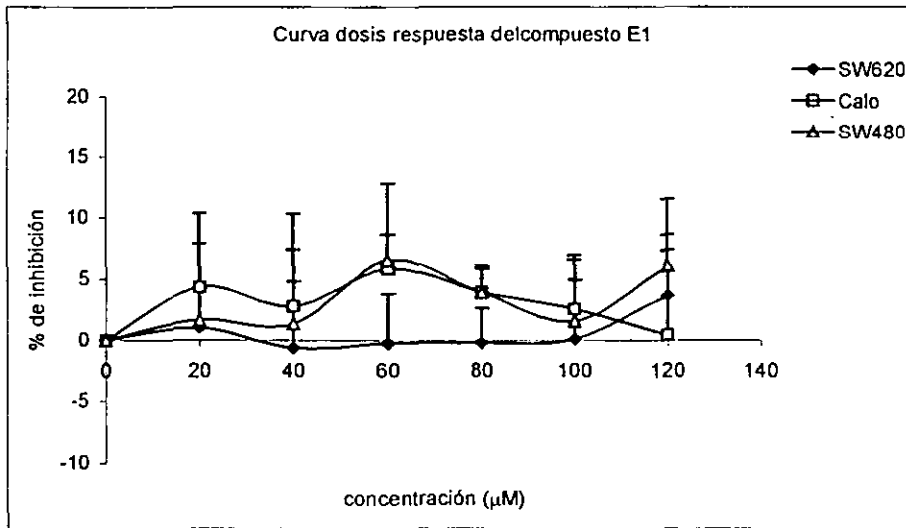
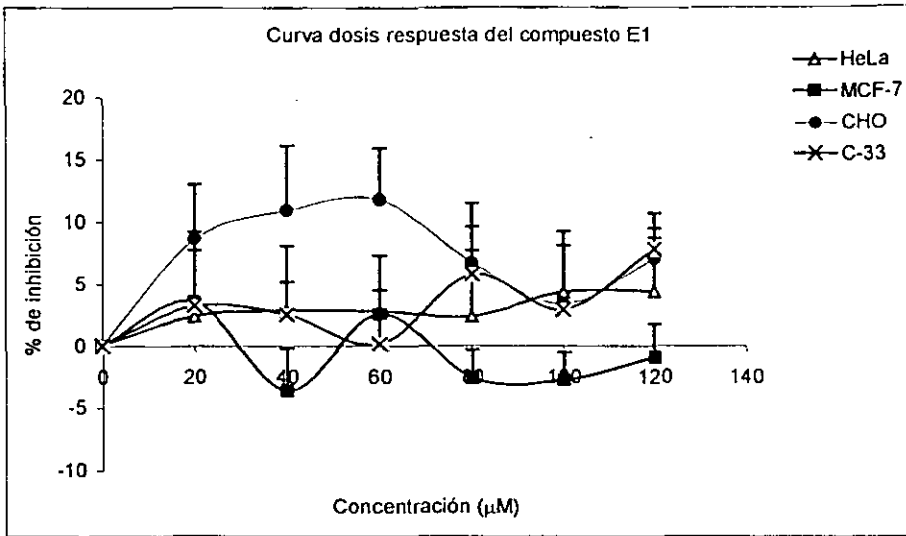


Fig. VI-2 Actividad citotóxica del compuesto derivado de la epotilona E1. El compuesto E1 se probó sobre las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología 5.2. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes los cuales se hicieron por cuadruplicado

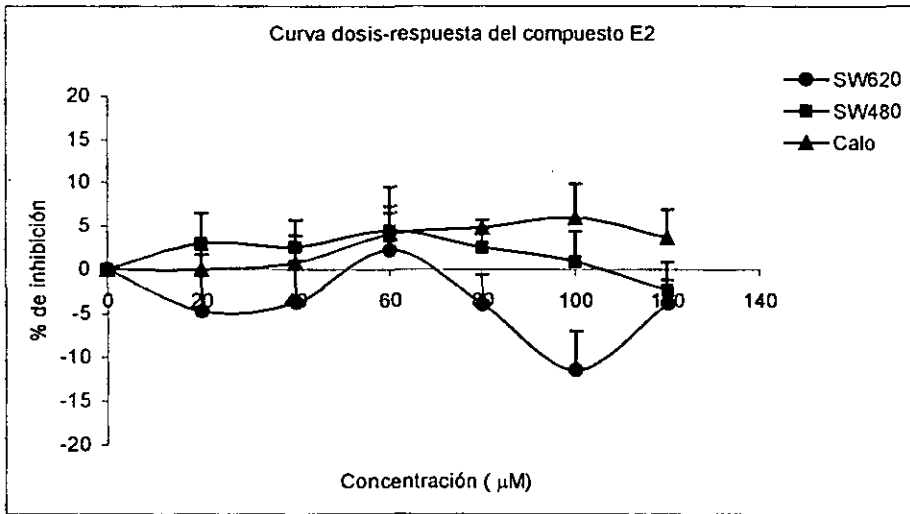
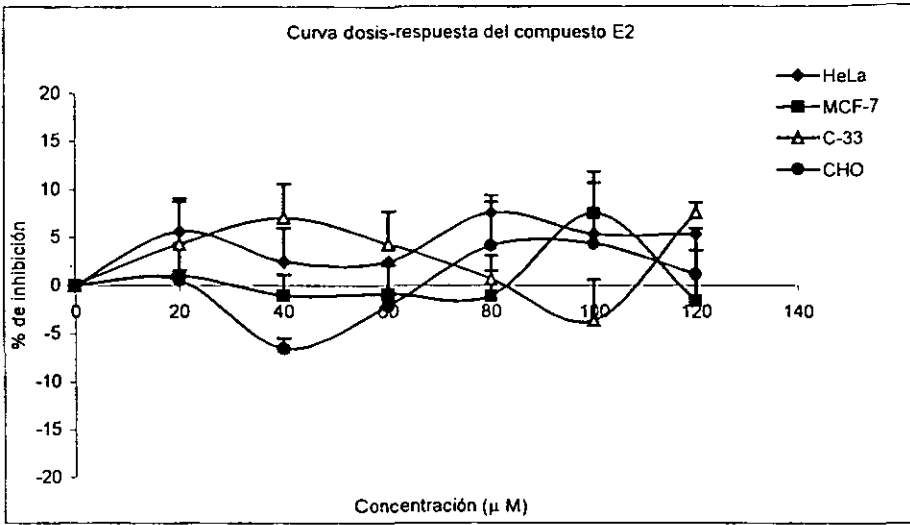


Fig. VI-3 Actividad citotóxica del compuesto derivado de la epitolina E2. El compuesto E2 se probó sobre las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó tal como se describe en la sección de metodología 5.2. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes los cuales se hicieron por cuadruplicado

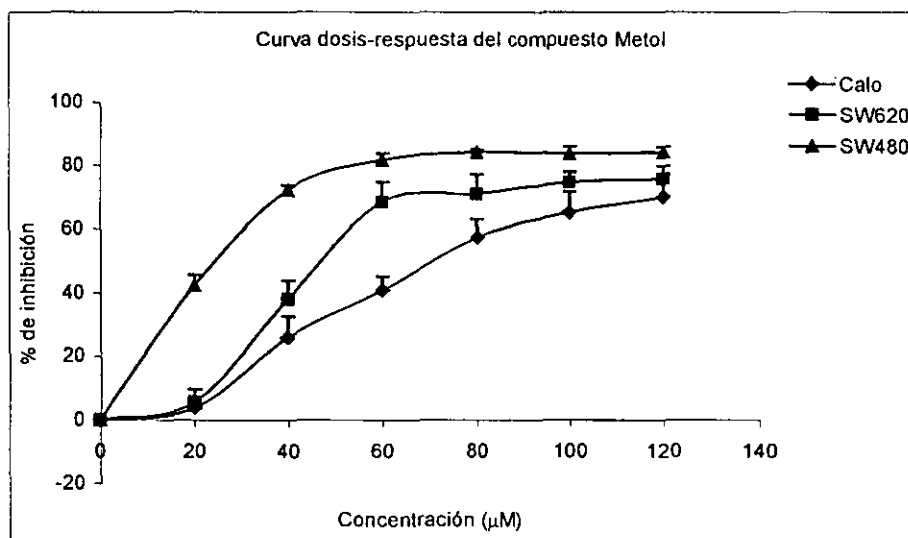
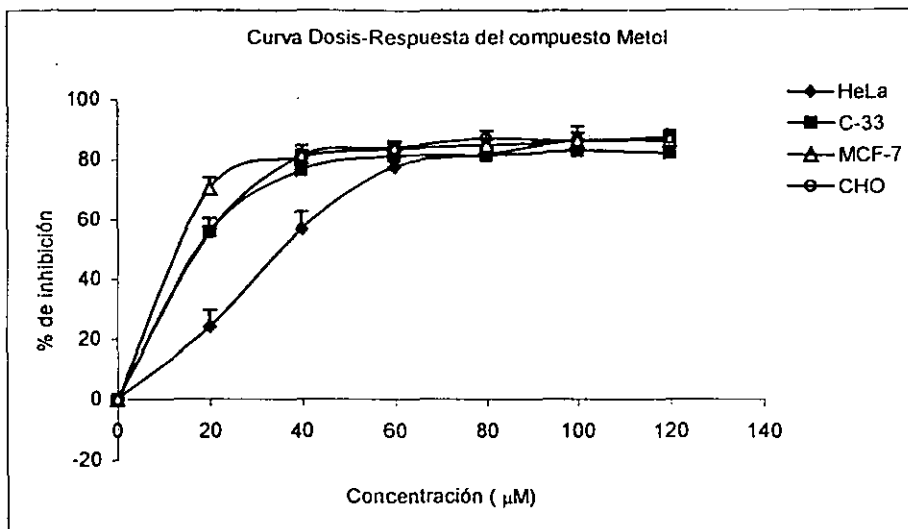


Fig. VI-4 Actividad citotóxica del compuesto metol. El metol se probó sobre las líneas celulares indicadas, la citotoxicidad se probó como se describe en la sección de metodología parte 5.2. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes los cuales se hicieron por cuadruplicado.

TABLA VI-2 EFECTO CITOTÓXICO DEL METOL

Concentració n (μ M).	Calo	SW620	SW480	HeLa	C-33	MCF-7	CHO
20	3.70 \pm 1.43	5.70 \pm 3.87	42.11 \pm 3.47	24.13 \pm 5.57	55.71 \pm 4.53	70.22 \pm 3.82	55.43 \pm 1.93
40	25.86 \pm 6.75	37.95 \pm 5.99	72.16 \pm 1.78	56.61 \pm 5.89	76.38 \pm 3.94	80.70 \pm 2.38	81.12 \pm 3.43
60	40.71 \pm 4.38	68.48 \pm 6.37	81.66 \pm 2.16	77.60 \pm 5.57	81.10 \pm 1.71	83.38 \pm 2.78	83.99 \pm 1.79
80	57.15 \pm 5.91	70.96 \pm 6.15	84.07 \pm 0.94	81.74 \pm 1.96	81.41 \pm 1.60	84.81 \pm 1.93	87.02 \pm 2.47
100	65.04 \pm 6.78	74.70 \pm 3.23	83.68 \pm 2.32	86.19 \pm 4.69	82.82 \pm 3.08	83.03 \pm 2.71	86.17 \pm 2.83
120	69.95 \pm 7.19	75.78 \pm 4.05	84.08 \pm 1.66	86.22 \pm 2.97	82.19 \pm 2.48	86.40 \pm 1.51	87.31 \pm 2.51

Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos cada una realizado por cuadruplicado. La actividad citotóxica se determinó como se describe en la metodología sección 5.2.

VII Análisis de resultados.

El cáncer es una enfermedad de alta incidencia a nivel mundial y en nuestro país ocupa un lugar importante. Una de las principales herramientas con las que se cuenta actualmente para su tratamiento es la quimioterapia. Los fármacos que se utilizan poseen efectos adversos que pueden ser severos, son costosos y por lo general poco efectivos contra tumores sólidos. Otro problema de la quimioterapia es el hecho de que algunos tumores presentan mecanismos de resistencia contra los fármacos, por estos motivos la búsqueda de nuevos compuestos citotóxicos que puedan ser candidatos para la quimioterapia es de gran importancia.

En el presente trabajo se determinó la actividad citotóxica de cuatro aril-fosfatos, F1, F2, F3 y F4, del p-metilaminofenol o metol y de dos compuestos relacionados con la epotilona, E1 y E2. Los aril-fosfatos analizados no presentaron actividad citotóxica significativa en ninguna de las líneas celulares utilizadas, al igual que los compuestos relacionados con la epotilona. El metol por el contrario presentó actividad citotóxica en todas las líneas utilizadas siendo la más sensible la de mama MCF-7 y la más resistente la de cérvix Calo.

Los aril-fosfatos fueron sintetizados basándose en que estos compuestos son hidrolizados por fosfatasas que se encuentran en el citosol de las células, ya que reportes de la literatura indican que son sustratos adecuados para fosfatasas ácidas de bajo peso molecular, y de esta manera se pueden generar compuestos fenólicos dentro de las células (Zhang y col. 1990). Los grupos fosfato de estos aril-fosfatos además poseen grupos etilo en ambos oxígenos ácidos del grupo fosfato para asegurar que no presenten carga negativa y que esto sea un impedimento para su entrada a las células. A una concentración de 20 y 40 μM no se observó actividad citotóxica (tabla VI-1) en las líneas celulares utilizadas, por lo que se decidió probar los compuestos F1 y F4 en la línea celular HeLa en un rango de concentraciones de 20 a 100 μM , para el compuesto F1 se encontró un ligero aumento en la citotoxicidad que no aumento conforme aumentaba la concentración (Fig. VI-1).

El compuesto F1 presenta la sustitución de los cinco átomos de hidrógeno del anillo aromático por átomos de flúor, el cual es un halógeno que retira carga

electrónica del anillo por efecto inductivo, el mecanismo de la acción de los fenoles está mediado por radicales libres y en el caso de compuestos fenólicos por el radical fenoxilo.

En F1 la presencia de los átomos de flúor favorecería la formación de este radical, el cual además sería estable y podría transportar al electrón no apareado a sitios susceptibles donde se pudiera iniciar el daño oxidativo a la célula. Probablemente el efecto citotóxico observado no aumente con la concentración debido a que la cantidad de radical producido sea similar en el rango de concentraciones utilizadas.

El compuesto F4 contrariamente a lo esperado tuvo un efecto estimulante del crecimiento celular (Fig. VI-1), el sustituyente metilo en posición para es un grupo electrodonador que no favorecería la formación y estabilización del radical fenoxilo y posiblemente el compuesto F4 solo pueda ser convertido en radical por especies reactivas de oxígeno muy inestables, como por ejemplo el radical hidroxilo, y de esta manera estar funcionando como un antioxidante en vez de comportarse como prooxidante, lo cual explicaría el aumento en la viabilidad observado.

El compuesto F2 presenta grupos isopropilo en posición 2 y 6 y el compuesto F3 presenta un grupo carbonilo que es voluminoso en posición 2, estos sustituyentes pueden representar un impedimento estérico para ser hidrolizados por las fosfatasas celulares y solo se producirían compuestos fenólicos debido a hidrólisis no enzimática y el efecto citotóxico encontrado se deba a interacciones no específicas con componentes celulares.

Con respecto a los compuestos relacionados con la epotilona no se observó efecto citotóxico (Fig. VI-2 y VI-3). Las epotilonas son compuestos que estabilizan la unión de los microtúbulos, y están constituidos por varias partes, una de ellas es el grupo tiazol. Nuestros resultados demuestran que esta parte de la molécula de la epotilona por si misma no presenta actividad citotóxica, lo que indica que otras partes de la molécula son importantes. Los estudios estructura actividad de la epotilona han sido exhaustivos y para estudiar a la molécula se ha dividido en

cuatro partes, los datos obtenidos de los múltiples análogos sintetizados han sido resumidos por Nicolau y colaboradores y se presentan en la figura VII-1.

El grupo farmacofórico de las epotilonas se encuentra en la región de la molécula que comprende del C-3 al C-5, de donde la conformación del grupo hidroxilo en C-3 es importante porque al parecer estabiliza el macrólido formando puentes de hidrogeno con el carbonilo en C-1. El grupo tiazol en C-15 es otro requerimiento estructural que pertenece al grupo farmacofórico debido a que crea un ambiente hidrofóbico (Ojiwa y col. 1999).

El reporte de Giannakakou y col. confirma que la molécula de la epotilona posee características espaciales que le confieren la habilidad de unirse a la tubulina, en su estudio encontraron que los grupos estructurales de la epotilona y taxanos se encuentran a distancias muy similares y sus experimentos con células que poseen mutaciones en la tubulina confirman que los sustituyentes de la epotilona ayudan a ésta a acomodarse en el sitio de unión, de los cuales el sustituyente en C-7, el ambiente hidrofóbico en C-12-C-13 y la cadena aromática del tiazol son los constituyentes principales.

Por otro lado el compuesto E1 posee dos epóxidos en su estructura, los epóxidos se han utilizado como agentes citotóxicos debido a la gran inestabilidad que presentan en sistemas biológicos y el compuesto E2 es α,β -insaturado por lo que puede sufrir reacciones nucleofílicas de tipo Michael con las biomoléculas celulares. Este tipo de mecanismo es altamente inespecífico para generar citotoxicidad por lo que la concentración de compuesto que se debe utilizar para observar una inhibición del crecimiento debe ser mayor a la concentración usada en este trabajo.

Por otro lado el compuesto metol presentó actividad citotóxica en todas las líneas celulares utilizadas. Es interesante el hecho de que la sensibilidad hacia este compuesto por parte de las líneas celulares sea tan variado lo cual puede ser explicado por el hecho de que las líneas celulares provienen de diferentes órganos lo que al igual que la quimioterapia les confiere diferente sensibilidad a los fármacos utilizados y también debido a que por ser células transformadas su expresión genética es muy variada.

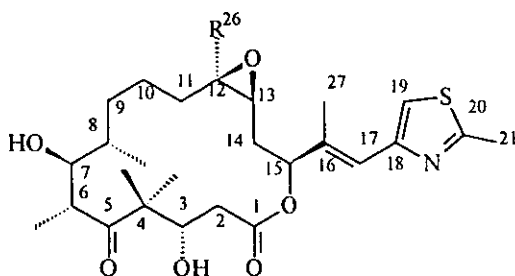


Fig. VII-1. Relación estructura actividad de las epotilona. La epotilonas se han dividido para su estudio en cuatro partes, la parte A corresponde de C-7 a C-11, la parte B de C-12 a C-15 incluyendo a C-26, la parte C corresponde de C-16 a C-21 incluyendo a C-27 y la parte D corresponde de C-1 a C-6 incluyendo el grupo éter entre C-1 y C-15. De la parte A se ha encontrado que la estereoquímica (6S, 7S) es crucial, la estereoquímica (8S) es importante, un grupo 8,8 dimetil no es tolerado al igual que un grupo dihidrogeno en la misma posición y que el tamaño del macrólido es importante. De la parte B se infirió que el epóxido en C12-C13 no es importante para estabilizar a la tubulina pero probablemente si para su actividad citotóxica, el grupo R cuando es Me, Et o Hex es tolerado, una olefina en C-12-C-13 es tolerada tanto en E como en Z y por último la estereoquímica de 15S es importante. De la parte C se ha demostrado que un anillo aromático directo en C-15 no es tolerado, la unión del tiazol en forma de éster no es tolerada, los oxazoles mantienen la actividad, el nitrógeno básico es esencial, sustituyentes en C-27 no son tolerados y la sustitución en C-20 por otros grupos es tolerada solo si no son voluminosos. Por ultimo de la parte D se ha encontrado que una olefina en C2-C3 es tolerada, y la estereoquímica (3S) es tolerada, un grupo 4,4 etano no es tolerado (Nicolau y col. 1998).

Con este compuesto se observó que la mayoría de las líneas celulares presentaban resistencia a las concentraciones más altas de nuestros experimentos lo cual se refleja en las gráficas de inhibición por una meseta donde la inhibición es prácticamente constante (Fig. VI-4).

Esto se debe a que dentro de la línea celular se encuentran células que son resistentes al compuesto y no sufren de efecto inhibitorio ni con la concentración máxima utilizada en este trabajo, por otro lado las células sensibles ya han sido inhibidas o ya hayan muerto.

Se ha reportado que este tipo de compuestos al igual que los fenoles, son agentes prooxidantes, por lo que cabría esperar que provocaran estrés oxidativo dentro de las células.

El metol por otro lado tiene la capacidad de formar una quinona debido a la presencia del grupo hidroxilo y del grupo metilamino en para, este mecanismo redox puede llevar a la reducción de ciertos substratos celulares. Un reporte de la literatura donde se utilizó hidroxiquinona en el tratamiento de ratones a los cuales se les injertó células de melanoma por vía subcutánea mostró que este compuesto aumentaba la supervivencia de los ratones tratados con respecto a los controles, además este compuesto no fue letal debido a que los ratones a los que no se les injertó el tumor pero fueron tratados con hidroquinona a una dosis de 80 mg/Kg sobrevivieron a todo el tratamiento (Chavin y col. 1980).

Los autores del trabajo anterior sugerían que la regresión de los melanocitos se debía a un mecanismo donde se involucraba la síntesis de DNA.

Reportes sobre un compuesto muy relacionado como el p-aminofenol han mostrado que la síntesis de DNA se ve inhibida *in vivo* utilizando este compuesto y lo mismo ocurre con compuestos fenólicos como el paracetamol, p-cresol y m-aminofenol (Wond y col. 1999).

La inhibición en la síntesis de DNA por parte del paracetamol y compuestos fenólicos relacionados se atribuye, aunque todavía es una propuesta, a la inhibición de la ribonucleótido difosfato reductasa (Wond y col. 1999). Esta enzima cataliza la reducción de los ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y en su mecanismo se encuentra involucrado un radical tirosil el cual se forma cada vez que se reduce un ribonucleótido.

Se propone que los fenoles interrumpen la formación de este radical comportándose como antioxidantes (Wond y col. 1999). El compuesto metol es muy probable que inhiba la síntesis de DNA aunado a que pueda ejercer un efecto prooxidante, por lo que sería interesante realizar trabajos posteriores donde se mida la capacidad del metol de inhibir la síntesis de DNA.

Los desoxirribonucleotidos son sintetizados en la fase S del ciclo celular solamente, debido al efecto perjudicial de éstos en las células, por lo que si el metol inhibe a la ribonucleótido difosfato reductasa es muy probable que sea específico de fase S para ejercer esta acción inhibitoria, pues la hidroxiurea que inhibe a esta enzima es específica de fase S.

Si el mecanismo de acción del metol es la inhibición de la síntesis de DNA es probable que las células presenten apoptosis, ya que si se interrumpe la interfase G1-S debido a la ausencia de desoxirribonucleótidos se activaría el punto de control del ciclo celular G1/S en el cual se sabe participa p53.

VIII. Conclusiones.

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

- Los aril-fosfatos y los compuestos derivados de la epotilona no presentan actividad citotóxica en el rango de las concentraciones utilizadas.
- El metol fue citotóxico en las diferentes líneas utilizadas a partir de un rango de concentraciones de 20 y 40 μM
- El metol es más activo en la línea celular MCF-7 y menos activo en la línea celular Calo.

IX. Perspectivas.

La búsqueda de nuevas moléculas con actividad citotóxica útiles en el tratamiento del cáncer es de importancia significativa pues muchos de los compuestos que se utilizan actualmente con este fin poseen efectos adversos que afectan el estado de salud general de los enfermos que son tratados y a veces resultan poco efectivos contra tumores sólidos, además de ser muy costosos.

El metol es un compuesto que presentó actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama humana, cáncer de cérvix humano, cáncer colorrectal humano y de ovario de hámster por lo que puede ser sometido a estudios sobre su mecanismo de acción y comprobar si en realidad produce estrés oxidativo e inhibición de la síntesis del DNA.

Después de comprobar su mecanismo de acción sería de interés realizar etapas preclínicas con animales de laboratorio para posteriormente realizar estudios clínicos adicionales con el fin de encontrar sus efectos toxicológicos.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adams J. M. y Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival, *Science* 281: 1322-1326 (1998).
- Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L., Abbott B. J., Shoemaker R. H. y Boyd M. R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.* 48: 589-601 (1988).
- Ashkenazi A. y Dixit V. M., Death Receptors: Signaling and Modulation, *Science*. 281:1305-1308 (1998).
- ATCC, Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7a ed Rockville, Maryland (1992)
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology Atlanta, GA Información tomada de la página de Internet <http://www.atsdr.cdc.gov/Toxprofiles/phs8920.html> con fecha de la última modificación Junio 22 del 2001.
- Bevan P., Ryder H. y Shaw I. Identifying Small-molecule Lead Compounds: the Screening Approach to Drug Discovery. *Trends Biotechnol.* 13: 115-121 (1995).
- Blagosklonny M. V., Schulte T., Nguyen P, Trepel J y Neckers M. Taxol-induces Apoptosis and Phosphorylation of Bcl-2 Protein Involves c-Raf and Represents a Novel c-Raf-1 Signal Transduction Pathway. *Cancer Res.* 56: 1851-1854 (1996).
- Bollag D. M., *et al.*, Epothilones, a New Class of Microtubule-stabilizing Agents with a Taxol-like Mechanism of Action. *Cancer Res.* 55:2325-2333 (1995).
- Boyd M. R. Status of the NCI Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen. *Princ. Pract. Oncol. Update* 3(10):1-12 (1989).
- Brown J. M. y Giaccia A. J., The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Res.* 58:1408-1416 (1998).
- Carmichael J., DeGraff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D. y Mitchell J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Radiosensitivity. *Cancer Res.* 47:943-946 (1987).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

- Conus S., Kaufmann T., Fellay I., Otter I., Rosse T. y Borner C. Bcl-2 is a Monomeric Protein: Prevention of Homodimerization by Structural Constrains. *EMBO J.* 19(7): 1534-1544 (2000).
- Costantini P., Decaudin D. Y Kroemer G. Mitochondrion as a Novel Target of Anticancer Chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 92(13): 1042-1050 (2000).
- Cowden C. J. y Paterson I. Cancer Drugs Better Than Taxol? *Nature.* 387:238-239 (1997).
- Crown J. y O'Leary M. The Taxanes: An Update. *Lancet* 355:1176-1178 (2000).
- Chabner B. A., Allegra C. J., Curt G.A. y Calabresi P., Fármacos Antineoplásicos pp.1309-1367 en *Goodman and Gilman Las Bases Farmacológicas de la terapeutica.* Hardman J. G. , Limbird L.E, Molinoff P. B, Ruddon R. W y Goodman A. (ed.). Mc Graw Hill Interamericana 9ª ed México 1996
- Chang R. Química Cap. 21 Elementos no metálicos y sus compuestos . Mc Graw Hill Interamericana 4ª ed México (1992).
- Chavin w, Jelonek E J, Reed A H y Binder L R, Survival of Mice Receiving Melanoma Transplants Is Promoted by Hydroquinone. *Science.* 208: 408-410 (1980).
- Darnell J. y Fodish H., Molecular Cell Biology, Capitulo 24 Cancer, 4ª ed. W. H. Freeman and Company, New York, pp 1054-1084 (1999)
- Dulbecco R., La naturaleza del cáncer, *Mundo Cient.* 3(22):168-179 (1983)
- Evan G. y Littlewood T. A Matter of Life and Cell Death. *Science.* 281: 1317-1321 (1998)
- Fadok V. A. y col. A Receptor for Phosphatidylserine-specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature* 405: 85-90 (2000).
- Farber E. Possible Mechanisms in Chemical Carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.* 75: 65-70 (1987).
- Filatov L., Golubovskaya V., Hurt J. C., Byrd L. L., Phillips J. M. Y Kaufmann W. K., Chromosomal Instability is Correlated with Telomere Erosion and Inactivation of G2 Checkpoint Function in Human Fibroblasts Expressing Human Papillomavirus Type 16E6 Oncoprotein, *Oncogene.* 16: 1825-1838 (1998).

- Fisher D. E. Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold. *Cell*. 78: 539-542 (1994).
- Foster B. A., Coffey H. A., Morin M. J. y Rastinejad F. Pharmacological Rescue of Mutant p53 Conformation and Function. *Science* 286: 2507-2510 (1999).
- Freshney R. I., *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique*, Cap. 2 Biology of the Cultured Cell pp 9-15 5ª ed. Wiley-Liss Edison N.J.. 1994 a.
- Freshney R. I., *Culture of Animal Cells A Manual of Basic Technique*, Cap. 19 Measurement of Viability and Citotoxicity pp. 287-308 5ª ed. Wiley-Liss Edison N.J. 1994 b.
- Giannakakou P., Gussio R., Nogales E., Downing K. H., Zaharevitz D. Bollbuck B., Poy G., Sacett D, Nicolaou K. C. y Fojo T. A Common Pharmacophore for Epothilone and Taxanes: Molecular Basis for Drug resistance Conferred by Tubulin Mutations in Human Cancer Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci* 97(6): 2904-2909 (2000).
- Goldman R., Claycamp G. H., Sweetland M. A., Sedlov A. V., Tyurin V. A., Kisin E. R., Tyurina Y. Y., Ritov V. B., Wenger S. L., Grant S. G. y Kagan V. E. Myeloperoxidase –Catalyzed Redox – Cycling of Phenol Promotes Lipid Peroxidation and Thiol Oxidation in HL-60 Cells. *Free Radic. Biol. Med.* 27(9/10): 1050-1063 (1999).
- Green D. R. y Beere H. M., Apoptosis: Gone but not Forgotten. *Nature*. 405:28-29 (2000).
- Green S. Nuclear Receptors and Chemical Carcinogenesis. *Trends Pharmacol. Sci.* 13:251-255 (1992).
- Gringauz A. *Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why*, Cap 4 Anticancer Drugs and Their Mechanism of Action pp. 93-139, Wiley-VCH Inc. Brooklyn, NY. 1997.
- Gross A., Jockel J., Wei M. C. y Korsmeyer S. J. Enforced Dimerization of Bax Result in Its Translocation, Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis. *EMBO J.* 171: 3878-3885 (1998).
- Haldar S., Jena N. Y Croce C. M. Inactivation of Bcl-2 by Phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4507-4511 (1995)

- Hansch C, McKarns S. C, Smith C J y Doolittle D. J. Comparative QSAR Evidence of Phenol-induced Toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* 127: 61-72 (2000).
- Harris P. J. y Ferguson L. R., Dietary Fibre: Its Composition and Role in Protection Against Colorectal Cancer. *Mutat. Res.* 290:97-110 (1993).
- Hengartner M. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature.* 407: 770-776 (2000).
- Hirsch T., Marchetti P., Susin S. A., Dallaporta B., Zamzami N., Marzo I., Geuskens M y Kroemer G. The Apoptosis-necrosis Paradox. Apoptogenic Proteases Activated After Mitochondrial Permeability Transition Determine the Mode of Cell Death. *Oncogene.* 15: 1573-1581 (1997).
- Hoffman K., The Modular Nature of Apoptotic Signaling Proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:1113-1128 (1999).
- Hong W. K. y Sporn M. B., Recent Advances in Chemoprevention of Cancer. *Science.* 278:1073-1077(1997).
- Hsu Y. y Youle R. J. Nonionic Detergents Induce Dimerization Among Members of the Bcl-2 Family. *J. Biochem.* 272(21): 13829-13834 (1997).
- Huang Y., Jonhson K. R., Norris J. S. y Fan W. Nuclear Factor- κ B/I κ B Signaling Pathway May Contribute to the Mediation of Paclitaxel-induced Apoptosis in Solid Tumor Cells. *Cancer Res.* 60:4426-4432 (2000)
- Jackson L.M. y Hawkey C. J., NSAIDs and the GI tract-Potential Hazards and Benefits. *Apoptosis.* 4:397-402 (1999)
- Jacobson M. D., Weil M. y Raff M. C., Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell.* 88:347-354 (1997).
- Janeway C. A. y Travers P. *Immunobiology The Immune System in Health and Disease*, Cap 6 The Thymus and the Development of T Lymphocytes Parte III The Development of Lymphocyte Repertoires, 3a ed. Current Biology Limited/Garland Publishing Inc, Londres 1997.
- Janeway C. A. y Travers P. *Immunobiology The Immune System in Health and Disease*, Cap 7 T-Cell Mediated Immunity Parte IV The adaptive Immune Respons, 3a ed. Current Biology Limited/Garland Publishing Inc, Londres 1997.

- Jones S. B., Cancer in the Developing World: a Call to Action. *Bri. Med. J.* 319: 505-508 (1999).
- Kerbel R. S., Tumor Angiogenesis: Past, Present and the Near Future. *Carcinogenesis*. 21(3): 505-515 (2000).
- Kim H. S., Kacew S. y Lee B. M., *In vitro* Chemopreventive Effects of Plant Polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*. 20(8):1637-1640 (1999).
- Kinloch R. A., Treherne J. M., Furness L. M. y Hajimohamadreza I. The Pharmacology of Apoptosis. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 35-42 (1999).
- Kolenko V. M., Uzzo R. G., Bukowski R. y Finke J. H., Caspase-dependent and -independent Death Pathways in Cancer Therapy. *Apoptosis*. 5: 17-20 (2000)
- Lewin B., *Genes VI*, Cap. 37 Oncogenes and Cancer pp 1131-1172 Oxford University Press, Oxford 1997.
- Li P., Dietz R. y von Harsdorf R. p53 Regulates Mitochondrial Membrane Potential Through Reactive Oxygen Species and Induces Cytochrome c-independent Apoptosis Blocked by Bcl-2. *EMBO J.* 18(21): 6027-6036 (1999).
- Loeb K.R. y Loeb L. A., Significance of Multiple Mutations in Cancer. *Carcinogenesis*. 21(3): 379-385 (2000).
- Lowe S. W. y Lin A. W. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis*. 21(3): 485-495 (2000).
- Marshall C. J., Tumor Suppressor Genes. *Cell*. 64: 313-326 (1991).
- Martinou J. C., Desagher S. y Antonsson B. Cytochrome c Release From Mitochondria: All or Nothing. *Nat. Cell Biol.* 2: E41-E43 (2000).
- Mathews C. J. y van Holde K.E., *Biochemistry*, Cap. 23 Metabolic coordination, metabolism control, and signal transduction pp.849-855. Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, CA. 1996.
- Milner J. Flexibility: the Key Function to p53 Function? *Trends Biochem. Sci.* 20: 49-50 (1995).
- Möller P. Walling H. y Knudsen L. E. Oxidative Stress Associated with Exercise, Psychological Stress and Life-style Factors. *Chem.-Biol Interact.* 102: 17-36 (1996).

- Nicolau K. C. y col. Synthesis of Epothilones A and B in Solid and Solution Phase. *Nature*. 387:268-272 (1997).
- Nicolau K. C., Roschangar F. y Vourloumis D. Chemical Biology of Epothilones. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:2014-2045 (1998).
- Norbury C. y Nurse P., Animal Cell Cycles and Their Control, *Annu. Rev. Biochem.* 61: 441-470 (1992).
- Ojiwa I., Chakravarty S., Inoue T., Lin S., He L., Horwitz S. B., Kuduk S. D. y Danishefsky S. J. A Common Pharmacophore for Cytotoxic Natural Products That Stabilize Microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 4256-4261 (1999).
- Peller S. Clinical Implications of p53: Effect on Prognosis, Tumor Progression and Chemotherapy Response. *Semin. Cancer Biol.* 8: 379-387 (1998)
- Perera F. P., Environment and Cancer: Who Are Susceptible?. *Science*. 278:1068-1073 (1997)
- Perera F. P., Uncovering New Clues to Cancer Risk. *Sci. Am.* 9: 40-46(1996).
- Pezzuto J. Taxol Production in Plant Cell Culture Comes of Ages. *Nat. Biotech.* 14: 1083 (1996)
- Pihan G. A. y Doxsey S. J., The Mitotic Machinery as a Source of Genetic Instability in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* 9: 289-302 (1999).
- Pitot H C y Dragan Y P, Chemical Carcinogenesis pp 201-267 en *Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. Klaasen C D (ed.) 5^a ed. McGraw Hill, N York. 1996
- Piomb J. A., Milroy R. y Kaye S. B. Effects of the pH Dependence of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide-Formazan Absorption on Chemosensitivity Determined by a Novel Tetrazolium-based Assay. *Cancer Res.* 49: 4435-4440 (1989).
- Rauth A. M. Physical Carcinogenesis-Ionizing Radiation pp.38-44 en *Comprehensive Textbook of Oncology*. Moosa A.R., Schimpff S. C. Robson M. C. (ed.), 2^a ed William And Wilkins. Baltimore, Maryland. 1991
- Reed J. C, Jurgensmeier J. M: y Matsuyama S. Bcl-2 Family Proteins and Mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 127-137 (1998).

- Reiter I., Krammer B. y Schwamberger G., Differential Effect Of Apoptotic Versus Necrotic Tumor Cells on Macrophage Antitumor Activities. *J. Immunol.* 163: 1730-1732 (1999).
- Rice-Evans C. y Burdon R. Free Radical –lipid Interactions and Their Pathological Consequences. *Prog. Lipid Res.* 32(1): 71-110 (1993).
- Ritland S. R. y Gendler S. J., Chemoprevention of Intestinal Adenomas in the Apc^{Min} Mouse by Piroxicam: Kinetics, Strain Effects and Resistance to Chemosuppression, *Carcinogenesis*, 20(1):51-58 (1999).
- Ritland S. R., Rowse G. J., Chang Y. y Gendler S. J., Loss of Heterozygosity Analysis in Primary Mammary Tumors and Lung Metastases of MMTV-MTAG and MMTV-*neu* Transgenic Mice. *Cancer Res.* 57:3520-3525 (1997).
- Rowinsky E. K. On Pushing the *Outer Edge of the Outer Edge* of Paclitaxel's Dosing Envelope. *Clin. Cancer Res.* 5(3): 481-486 (1999).
- Ruoslahti E., How Cancer Spreads. *Sci. Am.* 9: 72-77 (1996).
- Salven P., Orpana A. y Joensuu H., Leukocytes and Platelets of Patients with Cancer Contain High Levels of Vascular Endothelial Growth Factor. *Clin. Cancer Res.* 5: 487-491 (1999).
- Sato K, Sakagami H, Kashiwagi Y, Ida Y, Ueha T, Sugita Y, Yokoe I y Fujisawa S. Radical Intensity and Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and its Orthobisphenol Dimer. *Anticancer Res.* 19(5B): 3947-3952 (1999).
- Scott G. Antioxidants the Modern Elixir? *Chem. Brit.* 11: 879-882 (1995).
- Schmitt E., Cimoli G., Steyaert A. y Bertrand R. Bcl-xL Modulates Apoptosis Induced by Anticancer Drugs and Delays DEVDase and DNA Fragmentation-Promoting Activities. *Exp Cell. Res.* 240: 107-121 (1998).
- Selassie C. D., DeSoysa T. V., Rosario M., Gao H. y Hansch C. Phenol Toxicity in Leukemia Cells: a Radical Process?. *Chem.-Biol. Interact.* 113: 175-190 (1998).
- Sen S. y D'Incalci M., Apoptosis, Biochemical Events and Relevance to Cancer Chemotherapy. *FEBS Lett.* 307(1):122-127 (1992).
- Service R. F. Tumor-Killer Made; How Does It Work? *Science.* 274:2009 (1996).

- Shacter E., Williams R. M., Sentürker S. y Lee Y. Oxidative Stress Interferences with Cancer Chemotherapy: Inhibition of Lymphoma Cell Apoptosis and Phagocytosis. *Blood*. 96: 307-313 (2000).
- Shiff P. B., Fant J. y Horwitz S. B. Promotion of Microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature*. 277: 665-667 (1979)
- Sionov R. V. Y Haupt Y. The Cellular Response to p53: the Decision Between Life and Death. *Oncogene*. 18: 6145-6157 (1999).
- Sporn M. B., Carcinogenesis and Cancer: Different Perspectives on the Same Disease. *Cancer Res*. 51: 6215-6218 (1991).
- Suffness M. y Wall M. E., Discovery and Development of Taxol pp. 1-25 en *Taxol : Science and Applications*. Suffness M. (ed.). CRC Press, Boca Raton Florida 1995
- Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D. A., Vigna N., Oltersdorf T. y Reed J. C. IAP-Family Survivin Protein Inhibits Caspase Activity and Apoptosis Induced by Fas(CD95), Bax, Caspases, and Anticancer Drugs. *Cancer Res*. 58: 5315-5320 (1998).
- Temin H. M., Evolution of Cancer as a Mutation-driven Process. *Cancer Res*. 48:1697-1701 (1988).
- Thompson, C. B.; Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*. 267:1456-1461(1995)
- Trisha G. Systems for Identifying New Drugs Are Often Faulty. *Science*. 278: 1041-1042 (1997).
- Vallee R. B. The Use of Taxol in Cell Biology pp. 259-273 en *Taxol : Science and Applications*. Suffness M. (ed.). CRC Press, Boca Raton Florida 1995
- Ventura J. L. Gómez E. O. y Zentella A., Caspasas: Una Cascada de Proteasas Implicadas en la Muerte Celular por Apoptosis *Beb Bol. Educ. Bioquim*. 18(4): 153-165 (1999).
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 15;51(10):2515-20 (1991).