



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

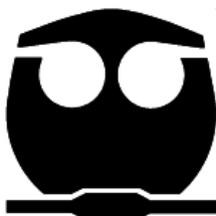


FACULTAD DE QUÍMICA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

MECANISMO DE MUERTE CELULAR POR UN NUEVO  
DERIVADO DE TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA D3CLP EN  
LA LÍNEA CELULAR HUMANA K-562

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**  
P R E S E N T A:  
Q.F.B. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ



Tutor: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

MÉXICO, D. F.

Marzo 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# MECANISMO DE MUERTE CELULAR POR UN NUEVO DERIVADO DE TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA D3CLP EN LA LÍNEA CELULAR HUMANA K-562

## RECONOCIMIENTOS

La presente tesis se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes, en el Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM

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

Se reconoce la colaboración del Dr. Julio Morán A, del Departamento de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular, en cuyo laboratorio se llevó a cabo la determinación de actividad de caspasas ejecutoras.

Se reconoce la asesoría técnica del M.C. José Dolores Solano Becerra en los experimentos de citometría de flujo y TUNEL.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA (IN202805), PAIP (6190-08) y PAPIIT (IN207207) UNAM, y CONACYT (46759-Q, P47829-Q). Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGAPA para la realización de la presente tesis.

El Jurado de examen estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Alejandro García Carrancá
Vocal	Dr. José Pedraza Chaverri
Secretario	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Suplente	Dra. Ma. Elena Ibarra Rubio
Suplente	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Carmen Sánchez Lecona y Aureliano González Luna, por darme incondicionalmente todo, enseñarme todo lo que han podido y guiarme para obtener la educación que me ha formado.

A mi esposa Cristina Coronel Cruz, por su comprensión y su valiosa ayuda durante la realización de este trabajo.

A mi pequeño Diego, por enseñarme nuevas cosas, aun siendo pequeño y motivarme.

A mis hermanos Jesús, Gilberto, Noel, Clemencia, Aureliano, Gabriel y Virginia, por su gran apoyo y orientación en cada momento, en cada una de mis decisiones.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Comité Tutoral, por sus comentarios acertados que contribuyeron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Marco A. Cerbón Cervantes, por la asesoría y apoyo para realizar esta tesis.

A la Dra. Angelina Quintero, quien dirigió este trabajo en sus inicios.

A la Dra. Adriana Mendoza, por el apoyo en el análisis estadístico.

A Leticia García, por el apoyo en trámites durante la maestría.

A los integrantes del laboratorio por sus comentarios y apoyo en la realización de los experimentos, sin un orden en particular: Gabriela, Elizabeth, Noemí, Carolina, Sonia, Paz, Naty, América, Mónica, Karina, Luciano y Javier.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. RESUMEN</b> .....	vi
<b>II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	viii
<b>III. ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER</b> .....	1
1.1.1 Definición .....	1
1.1.2 Tipos .....	2
1.1.3 Epidemiología .....	3
1.1.4 Etiología .....	4
<b>2. PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	5
<b>3. CICLO CELULAR</b> .....	6
3.1 Fases .....	7
3.2 Regulación .....	8
<b>4. TERAPIA DEL CÁNCER</b> .....	12
4.1 Cirugía .....	13
4.2 Radioterapia .....	13
4.3 Quimioterapia .....	14
4.3.1 Agentes activos durante la división celular .....	15
4.3.2 Agentes activos no dependientes de la división celular .....	18
4.3.3 Toxicidad de la quimioterapia del cáncer .....	20
4.4 Hormonas y antagonistas de hormonas .....	21

4.5 Inmunoterapia .....	22
4.6 Terapia con enzimas .....	23
<b>5. MUERTE CELULAR .....</b>	<b>23</b>
5.1 Muerte celular programada .....	23
5.1.1 Apoptosis o muerte celular tipo I .....	25
5.1.2 Autofagia o muerte celular tipo II .....	27
5.1.3 Paraptosis .....	28
5.1.4 Catástrofe mitótica .....	28
5.1.5 Anoikis .....	29
5.1.6 Exocitotoxicidad .....	29
5.2 Muerte celular accidental .....	29
<b>6. ANTECEDENTES .....</b>	<b>31</b>
<b>7. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>8. HIPÓTESIS .....</b>	<b>37</b>
<b>9. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>37</b>
<b>9.1 OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>37</b>
<b>10. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>12. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>13. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>14. REFERENCIAS .....</b>	<b>72</b>

## I. RESUMEN.

Las tiazolo[5,4-b]quinolinas son compuestos estructuralmente relacionados con la mamsacrina, potente compuesto antileucémico, que tiene la capacidad de intercalarse al ADN y de inhibir la ADN topoisomerasa II. D3CLP es un derivado de tiazolo[5,4-b]quinolina que ha mostrado ser citotóxico en diversas líneas tumorales.

En el presente estudio se determinó el mecanismo de muerte celular inducido por D3CLP en células de leucemia mielógena crónica K-562. Para esto, después de tratar células K-562 con 7.8  $\mu$ M de D3CLP disuelto en DMSO, durante diferentes tiempos, se estudió el contenido de ADN por citometría de flujo, para analizar posibles alteraciones del ciclo celular. Empleando el ensayo de TUNEL, se evaluó la posible fragmentación del ADN en células tratadas y se determinó fluorométricamente la actividad de caspasas ejecutoras, en extractos de proteínas de células tratadas. También, para estudiar la interacción de D3CLP con el ADN, se analizó *in vitro* la intercalación de D3CLP en el ADN, mediante el desplazamiento de bromuro de etidio a partir de ADN, por fluorometría y la inhibición de la topoisomerasa II analizando la relajación de ADN superenrollado. Además, para conocer que tan citotóxico es D3CLP para células no tumorales se determinó la citotoxicidad en linfocitos de sangre periférica mediante la reducción de MTT.

Los resultados del análisis de contenido de ADN por citometría de flujo muestran que, el tratamiento de células K-562 con D3CLP no produce arresto del ciclo celular en alguna de sus fases, previo a la muerte celular, pero induce la aparición de una población subdiploide desde las 12 horas. Por la técnica de TUNEL la fragmentación de ADN fué positiva desde las 12 horas, se apreciaron algunas características sugerentes de apoptosis como la condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo. En el estudio de la actividad de caspasas ejecutoras, se observó que en la muerte celular inducida se activan las caspasas ejecutoras, con un máximo de actividad a las 24 horas de tratamiento. Se encontró que D3CLP puede intercalarse al ADN, mediante el desplazamiento del bromuro de etidio a partir de ADN. Por el análisis de relajación de ADN superenrollado, se observó que D3CLP puede inhibir la actividad de la topoisomerasa II *in vitro*. Al estudiar la citotoxicidad en linfocitos, se observó que D3CLP

es aproximadamente 4 veces más citotóxico para células tumorales que para las no tumorales.

La presencia de ADN fragmentado, condensación de cromatina, fragmentación del núcleo y la actividad de caspasas ejecutoras nos indica que, el tratamiento de células K-562 con D3CLP induce apoptosis. En la inducción de esta muerte pueden participar sus propiedades de intercalación al ADN e inhibición de la topoisomerasa II.

El tipo de muerte inducido por D3CLP en células K-562 y el que sea más citotóxico para células tumorales, lo hace un compuesto de interés, para su posible uso en el tratamiento de pacientes.

## II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### A) Figuras

<b>Figura 1.</b> Gráfica de funciones por cáncer .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructuras de 9-anilinoacridina y amsacrina (m-AMSA) .....	31
<b>Figura 3.</b> Tiazolo[5,4-b]quinolina .....	31
<b>Figura 4.</b> Primer serie de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina .....	34
<b>Figura 5.</b> Segunda serie de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina .....	33
<b>Figura 6.</b> Estructura química del derivado tiazolo[5,4-b]quinolina D3CLP .....	35
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de una cámara de Neubauer .....	44
<b>Figura 8.</b> Histogramas representativos de citometría de flujo de células K-562 con diferentes tratamientos .....	55
<b>Figura 9.</b> Distribución de células en las fases del ciclo celular .....	57
<b>Figura 10.</b> Determinación de la fragmentación de ADN en células K-562 tratadas con D3CLP, mediante TUNEL .....	60
<b>Figura 11.</b> Actividad de caspasas ejecutoras en células K-562 tratadas con D3CLP a diferentes tiempos .....	62
<b>Figura 12.</b> Actividad de caspasas en células K-562 tratadas con D3CLP comparada con DMSO a 24 horas de incubación .....	63
<b>Figura 13.</b> Inhibición de la topoisomerasa II $\alpha$ por D3CLP <i>in vitro</i> .....	67
<b>Figura 14.</b> Citotoxicidad de D3CLP en células no tumorales .....	69

### B) Tablas.

<b>Tabla 1.</b> Agentes asociados a la generación de cáncer en humanos .....	5
<b>Tabla 2.</b> Actividad citotóxica (IC <sub>50</sub> ) de los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina de la segunda serie y m-AMSA como referencia, en líneas celulares humanas tumorales .....	33
<b>Tabla 3.</b> Actividad citotóxica (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M) de los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina de la cuarta serie .....	35
<b>Tabla 4.</b> Constante aparente de desplazamiento de bromuro de etidio del ADN para derivados tiazolo[5,4-b]quinolina .....	65

### III. ABREVIATURAS.

Ac-DEVD-AMC	Péptido sintético, acetil-Asp-Glu-Val-Asp- $\alpha$ -(7-Amino-4-metilcumarina)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIF	Factor inductor de apoptosis
AMC	7-Amino-4-metilcumarina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de Adenosina
CAD	Desoxinucleotidasa activada por caspasas
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CHAPS	Sulfonato de 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNasa	Desoxinucleotidasa
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenediamino tetra-acético
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol tetra-acético
Fos	Gen que codifica un factor de transcripción nuclear promoviendo la proliferación celular
Hepes	Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
ICAD	Inhibidor de CAD
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
m-AMSA	amsacrina
MAP	Proteínas asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos

MCP	Muerte celular programada
MTT	Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MyC	Gen que codifica un factor de transcripción nuclear promoviendo la proliferación celular
NCCD	Comité de nomenclatura en muerte celular
NCI	Instituto Nacional del Cancer, U.S.A
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PBS-EDTA	Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PHA	Fitohemaglutinina
PMSF	Fluoruro de fenilmetil sulfonilo
Rad	Unidades de radiación
Ras	Gen que codifica una proteína G, capaz de hidrolizar GTP y participa en la proliferación celular
RNasa	Ribonucleotidasa
rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Solución amortiguadora de tris, acetato de sodio y EDTA
TdT	Transferasa de desoxinucleotido terminal
TUNEL	Transferencia de uridina marcada a los extremos en el ADN

---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

En la lucha contra el cáncer es importante conocer diversos aspectos de la fisiología celular normal y patológica. Entre ellos la función del ciclo celular, la bioquímica de los procesos metabólicos básicos de la célula, así como los diversos aspectos genéticos que regulan estas funciones.

Por otro lado en la actualidad se ha avanzado enormemente en el conocimiento de los procesos que determinan la supervivencia, proliferación y la muerte celular programada. Esto último ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias tanto en la investigación, como en el tratamiento del cáncer.

A lo largo de esta tesis hablaremos de los aspectos básicos de la fisiopatología de esta enfermedad así como las diversas estrategias terapéuticas que se conocen. Finalmente se describirá la investigación realizada sobre el tipo de muerte celular inducido por el derivado tiazolo[5,4-b]quinolina D3CLP. Discutiremos aspectos bioquímicos y moleculares del mecanismo de muerte celular inducido.

### 1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER.

Existen muchos tipos de cáncer, y actualmente, estos se han convertido en un problema de salud a nivel mundial. El conocimiento de los principales procesos de desarrollo del cáncer ha permitido tener avances en su tratamiento, así como en su prevención.

#### 1.1.1 Definición.

El término cáncer (del latín cangrejo) se usa para definir a una enfermedad caracterizada por un desequilibrio entre la división y la muerte celular (Hanahan D, Weinberg RA. 2000). Las células neoplásicas pueden invadir los tejidos vecinos y pueden diseminarse a otras partes del cuerpo (National Cancer Institute, 2008).



---

---

Cuando un tumor se encuentra bien delimitado, en la mayoría de casos no representa una amenaza para la vida del paciente, y puede eliminarse quirúrgicamente, a este tipo de tumores se les ha denominado tumores benignos.

Las células neoplásicas pueden adherirse y penetrar el endotelio vascular; de ahí, que pueden diseminarse a otras partes del cuerpo a través de la circulación sanguínea o del sistema linfático, invadiendo otros tejidos y generando nuevos tumores en un proceso conocido como metástasis. La metástasis es un indicador de la malignidad de un tumor, en la cual, el crecimiento neoplásico desorganiza la función normal de los tejidos y órganos. Además, los tumores metastásicos pueden originar nuevas metástasis. A este tipo de tumores se les denomina tumores malignos (National Cancer Institute, 2008).

### **1.1.2. Tipos.**

Se sabe que el cáncer puede desarrollarse en células de cualquier tejido y a cualquier edad. A continuación, se mencionan algunos de los cánceres que se presentan en humano: **i) Teratoma.** Es un tumor de células germinales que puede contener varios tipos de tejidos en la zona afectada, como pelo, músculo y hueso. Los teratomas se presentan con más frecuencia en los ovarios, en los testículos y la parte baja de la espalda en los niños. Además, no todos los teratomas son malignos. **ii) Carcinoma.** Es el cáncer que se genera en la piel o en los epitelios que cubren órganos internos. **iii) Leucemia.** Es el cáncer que se produce en células hematopoyéticas, como las de médula ósea, y origina un gran número de glóbulos anormales, que entrarán en el torrente sanguíneo. **iv) Linfoma.** Cáncer que se produce en las células precursoras del sistema inmunitario. **v) Mieloma.** Cáncer de células sanguíneas, particularmente de glóbulos blancos. **vi) Sarcoma.** Es el cáncer que se produce en hueso, tejido adiposo, cartílago, músculo, vasos sanguíneos y tejido conjuntivo o de sostén. **vii) Gliomas:** Tumor de alta incidencia en cerebro, originado en células gliales. **viii) Melanoma.** Forma de cáncer que empieza en las células de la piel que producen melanina (melanocitos). Puede empezar como un lunar (melanoma cutáneo), o también puede comenzar en



---

---

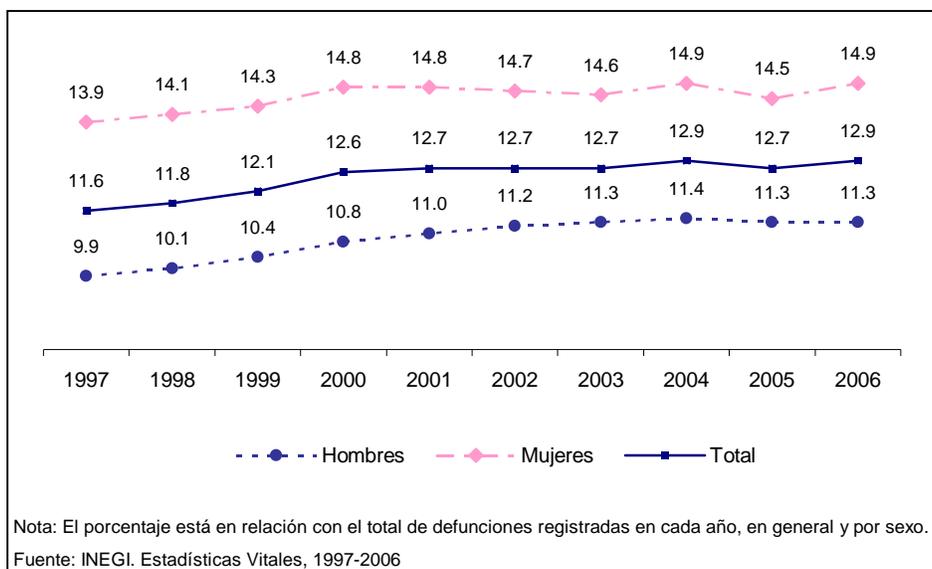
tejidos pigmentados como en el ojo. Puede presentarse en células de la piel que no producen melanina.

El cáncer suele nombrarse dependiendo de la zona u órgano en el que se origina. En general, se denominan como “cáncer” y a continuación se indica la parte del cuerpo u órgano en el cual se originaron, algunos ejemplos son: cáncer de cuello, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de garganta, etc. (National Cancer Institute, 2008).

### **1.1.3 Epidemiología.**

El cáncer es un problema que tiene gran importancia en el ámbito de la salud en nuestro país y en el resto del mundo. La incidencia global del cáncer es extremadamente variable entre distintas regiones del mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que en el 2005 murieron 7.6 millones de personas por cáncer y que más del 70% de dichas defunciones se produjeron en países de ingresos bajos y medios, cuyos recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes (OMS, 2006).

En México, el cáncer se encuentra dentro de las tres primeras causas de muerte. El INEGI reportó que en 2006 el número de defunciones por esta causa fue de 63 888, representado el 12.9% de las defunciones en ese año (Figura 1). En el grupo de 5 a 14 años, los tumores malignos representan la segunda causa de mortalidad con 16.3% de los decesos; en este grupo la leucemia provocó poco más de la mitad (52.2%) de los fallecimientos ocurridos por cáncer (INEGI, 2008).



**Figura 1.** Gráfica defunciones por cáncer. Porcentaje de defunciones generales y por sexo causadas por tumores malignos, en México de 1997 a 2006. El porcentaje está en relación con el total defunciones registradas cada año, en general y por sexo. Tomado de INEGI, 2008.

### 1.1.4 Etiología.

El cáncer es una enfermedad de carácter multifactorial y en su generación pueden participar diversos factores, ya sea físicos como radiaciones ionizantes (gamma, rayos X) y radiaciones ultravioleta, químicos como pueden ser agentes alquilantes, hidrocarburos aromáticos, colorantes, asbesto y contaminantes de alimentos, o biológicos como son algunos virus (tabla 1). Las mutaciones son la causa de cáncer. Se han encontrado mutaciones en muchos genes en células neoplásicas. Estas mutaciones ocurren en genes que controlan el ciclo celular, diferenciación celular, genes implicados en la reparación del ADN, muerte celular programada, inmortalización y mecanismos de migración y capacidad de adhesión (Alison, 2002).

Un agente carcinógeno es aquel que en animales, que no han tenido contacto previo con dicho agente, conduce a un aumento significativo de incidencia de

neoplasias de uno o más tipos, comparado con animales que no tuvieron contacto alguno con el agente carcinógeno bajo análisis (Pitot y Loeb, 2002).

**Tabla 1.** Agentes asociados a la generación de cáncer en humanos.

<b>Agente carcinógeno</b>	<b>Cáncer asociado</b>
<b><i>Estilo de vida</i></b>	
Tabaco	Boca, faringe, laringe, pulmón, esófago y vejiga
Alcohol	Boca, laringe, esófago e hígado
Dieta (exceso de calorías, grasas y proteínas)	Mama, colon, endometrio y vesícula biliar
<b><i>Riesgo profesional</i></b>	
Asbesto, Cromo	Mesotelioma y pulmón
Arsénico	Pulmón
Aminas aromáticas	Vejiga
Benceno	Leucemia
Fabricación y reparación de zapatos	Carcinoma nasal
Cloruro de vinilo	Angiosarcoma hepático
Industria del caucho	Leucemia y vejiga
Alcohol isopropílico	Senos paranasales
Hollín, alquitrán y aceites	Piel, pulmón, vejiga y tubo gastrointestinal
Refinado del níquel	Pulmón y senos paranasales
<b><i>Iatrógenos</i></b>	
Alquilantes	Vejiga y leucemia
Azatioprina	Linfoma, sarcoma y piel
Clornafazina	Vejiga
Dietilestilbestrol	Vagina (carcinoma de células claras)
Fenacetina	Riñón
Metoxipsoraleno (con luz UV)	Piel

Modificado de Estapé y González, 1995.

## **2. Proliferación celular.**

Dentro de los factores que promueven la proliferación celular se encuentran aquellos receptores que son capaces de activar cascadas de señalización que



---

---

culminen en la actividad mitótica o proliferación. Estos receptores son capaces de fijar proteínas (ligandos) como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés). Ambos factores de crecimiento se unen a receptores cinasas de tirosina en la membrana celular. Otros ejemplos de moléculas que promueven la proliferación celular son las Interleucinas y prolactina, citocinas que actúan como hormonas de crecimiento. Se unen a receptores de membrana, que no son propiamente cinasas, pero son capaces de transducir señales de proliferación. Las hormonas esteroideas como los estrógenos tienen actividad mitótica después de unirse a sus receptores intracelulares (Alison, 2002).

En humanos, la progresión de un tejido normal a un cáncer invasivo puede ocurrir en un periodo de 5 a 20 años y está influenciado por factores genéticos, hereditarios y por cambios genéticos somáticos. La progresión del cáncer está dirigida por la acumulación de cambios genéticos. Las alteraciones en los protooncogenes contribuyen a un crecimiento celular descontrolado o a una pérdida de la senescencia. Esto puede ser mediante la activación persistente de la transducción de señales que estimulan la proliferación celular. El crecimiento descontrolado, también puede ser causado por una desregulación a nivel de factores de transcripción. En el cáncer se presenta una alta proliferación celular debido a alteraciones que afectan el control del ciclo celular (Devita, et al., 2001).

### **3. Ciclo celular.**

El conocimiento del ciclo celular no sólo es importante para entender la proliferación celular, sino que nos permite entender cómo se reemplazan células dañadas en procesos como la cicatrización de heridas y, particularmente en este trabajo nos interesa conocer las bases por las cuales las células neoplásicas proliferan, ya que en el cáncer, a diferencia de las células normales, el control de ciclo celular está dañado. En las células neoplásicas se presentan alteraciones en la regulación de la proliferación a diferentes niveles (Alison, 2002).



---

---

El ciclo celular comprende una serie de procesos en secuencia ordenada que permiten que la célula se divida. En humanos, el tiempo que transcurre desde que ocurrió una mitosis hasta que vuelve a presentarse varía mucho de un tipo de célula a otro. Por ejemplo, las células de hígado de un mamífero tienen ciclos celulares que pueden durar más de un año. Sin embargo, la mayoría de las células de un mamífero tienen ciclos celulares que duran 24 horas (Alberts, 2002).

### 3.1 Fases.

Para su estudio, el ciclo celular puede dividirse en distintas fases: G1, S, G2, M y, eventualmente, G0. Una célula se encuentra dividiéndose únicamente durante la fase M. Al periodo del ciclo celular en el que la célula no se está dividiendo, se le llama interfase y comprende las fases G1, S, G2 y G0 cuando se presenta. A continuación, nos enfocaremos a las fases del ciclo celular referente a células humanas.

**Fase G1.** En esta fase las células inician el proceso de proliferación, que puede ser desde una fase M o una fase quiescente (G0), donde permanecieron con metabolismo activo y sin proliferar. Durante la fase G1 la célula recolecta nutrientes y factores de crecimiento a partir del torrente sanguíneo. La duración de esta fase en cultivos de células es altamente variable, va desde 6 horas hasta más de 24 horas, a diferencia de la uniformidad en el tiempo de las otras fases.

**Fase S.** Al inicio de esta fase se ha superado el punto de restricción (R), ya que la célula detecta que se encuentra en las condiciones apropiadas de temperatura, nutrientes, factores de crecimiento y tamaño necesarios para iniciar la síntesis de ADN. También, aumentan las enzimas que participan en la replicación del ADN y se desplazan del citoplasma al núcleo para iniciar la replicación del genoma. A cada célula le toma entre 6-8 horas replicar cerca de 40 000 genes agrupados en 23 pares de cromosomas. En esta fase, si hay daño al ADN, la célula detiene la replicación hasta que dicho daño se ha reparado, y si no es posible reparar dicho daño la célula activa mecanismos de muerte celular programada.



---

---

**Fase G2.** Puede durar varias horas, probablemente para producir más ARN, enzimas y proteínas necesarias al final de la división en cada célula. En promedio, en las células de mamíferos dura aproximadamente 2 horas. Una célula que era diploide en este momento se observa tetraploide. La célula debe comprobar que ha replicado su ADN completamente y que lo ha hecho una sola vez.

**Fase M.** La mitosis, denominada fase M, tiene una duración menor a una hora y está subdividida en varios estadios. En esta fase, los cromosomas duplicados se condensan, la membrana nuclear se desintegra y los cromosomas se segregan en cantidades equivalentes mediante estructuras de tubulina (huso mitótico). Posteriormente, el huso mitótico se desensambla y se forman dos núcleos con sus respectivos cromosomas. Finalmente, inicia la citocinesis o división celular para formar dos células hijas con la misma información genética (Alison, 2002; Alberts, 2002).

### 3.2 Regulación.

El ciclo celular se encuentra finamente regulado en las células normales por diferentes moléculas y vías de señalización, algunas de las cuales son:

- i) Factores de crecimiento. Son moléculas de naturaleza proteica que poseen dominios específicos que son reconocidos por receptores transmembranales. La unión de los factores de crecimiento a sus receptores induce cambios en la fracción citoplasmática de estos últimos, activando vías de señalización específicas en la que participa un grupo heterogéneo de segundos mensajeros entre los que se encuentran cinasas de proteínas como Ras, Fos, MyC y MAP cinasas, moléculas pequeñas como el fosfato de inositol y AMPc, y iones como  $Ca^{++}$ ,  $H^+$  y  $Zn^{++}$ . Los factores de crecimiento participan en vías de señalización culminan con la expresión de genes que se requieren para la proliferación celular.
- ii) Ciclinas. Pertenecen a otro grupo de proteínas que participan en la regulación del ciclo celular. La concentración de las ciclinas varía según la fase del ciclo celular, la cual depende de la regulación en su transcripción, así como de su



---

---

degradación. Existen cuatro tipos principales de ciclinas (D, E, A y B). Las ciclinas activan a varios tipos de cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés), formando complejos capaces de fosforilar proteínas que participan en vías de proliferación (Harper y Brooks, 2005).

iii) Protooncogenes y genes supresores de tumores. Los protooncogenes, codifican para proteínas que participan en la transducción de señales que promueven la división celular. Inversamente, los genes supresores de tumores codifican para proteínas capaces de inhibir la proliferación celular. Esas señales convergen en puntos que regulan el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S activando CDKs (Holland y Frei, 2000).

Los oncogenes derivan de protooncogenes, que son genes celulares que controlan normalmente los procesos de proliferación. Se ha observado que mutaciones en los protooncogenes producen variantes desreguladas (oncogenes). Los cuales codifican para proteínas que desencadenan señales positivas de proliferación que estimulan a la célula a entrar al ciclo celular de manera continua (Hernández y Ríos, 1999). La función de las proteínas codificadas, tanto por los protooncogenes, como por los oncogenes es la misma, activar señales de proliferación. Para el caso de los oncogenes, dicha señalización está activada constitutivamente. Algunos ejemplos de oncogenes son *C-myc*, *N-myc*, *L-myc*, *erb-B*, *abl*, *ras*, *bcr-abl* y *mdm-2*.

Los protooncogenes pueden clasificarse dependiendo de donde se localiza la proteína respectiva, pueden ubicarse en la membrana celular, citoplasma o núcleo. Muchas de las oncoproteínas citoplasmáticas presentan actividad de cinasa de tirosina y con ello, regulan una cascada de señalización que regula la mitosis. La oncoproteína Ras transduce señales de proliferación celular cuando se unen a GTP o GDP. En aproximadamente el 30% de cánceres, en este caso, ras permanece en su forma activa de modo constitutivo, induciendo la proliferación celular (Alison, 2002).



---

---

Algunos protooncogenes son activados por eventos que cambian su expresión pero que mantienen la secuencia codificante inalterada. El protooncogen mejor caracterizado es el c-myc, cuya expresión es elevada por varios mecanismos, el más común es la inserción de un genoma retroviral en la vecindad del gen a lo cual se le atribuye la pérdida de su control normal y su expresión incrementada promueve la transcripción. También, las translocaciones pueden originar un gen híbrido, como sucede en el cromosoma filadelfia presente en pacientes con leucemia mielógena crónica y leucemia linfoblástica aguda, en las que presenta la cinasa de tirosina Bcr-Abl (Hernández y Ríos, 1999).

La función de las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores no se pierde cuando se produce una mutación que inactive un alelo, ya que dicha función puede ser cubierta por la proteína codificado por el otro alelo y sólo cuando los dos alelos se encuentran mutados, la falta de su expresión puede contribuir a la formación y progresión de cáncer (Alison, 2002).

Dentro de los genes supresores de tumores se encuentran los genes *p53*, *Rb* y *ATM*. Muchos tipos de tumores presentan mutaciones en el gen *p53*, siendo la mutación más común en la mayoría de cánceres humanos. Se ha encontrado que células que tienen mutado *p53* no pueden arrestar el ciclo celular en fase G1, ni pueden entrar en apoptosis eficientemente después de la exposición a luz UV. La proteína p53 se induce rápidamente cuando hay daño al ADN y actúa como factor de transcripción, regulando la expresión de genes que tienen en sus promotores secuencias reconocidas por la proteína p53. La proteína supresora de tumores p53 tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular arrojando a las células en los puntos de control de G1 y G2 cuando hay daño al ADN y puede inducir apoptosis cuando dicho daño no puede ser reparado. La pérdida de *p53* puede ocasionar inestabilidad genética ocasionando un aumento en el número de mutaciones (Holland y Frei, 2000).



---

---

Otra proteína supresora de tumores es Rb, la cual no se produce en el retinoblastoma. Rb puede formar complejos con muchas otras proteínas celulares incluyendo al factor de transcripción E2F. Cuando Rb está hipofosforilada puede formar un complejo con E2F y de este modo, E2F no puede promover la transcripción de la ciclina E, por lo que el ciclo celular no puede pasar el punto de control R. E2F es liberado hasta que la proteína Rb sufre nuevas fosforilaciones. En el caso del retinoblastoma, al no estar presente Rb, E2F se encuentra libre y puede promover la síntesis de ciclina E comenzado el ciclo celular, además de otros genes necesarios en la fase S como la dehidrofolato reductasa, la polimerasa A de ADN y la timidina cinasa (Alison, 2002; Holland y Frei, 2000).

La proteína ATM es codificada por el gen *ATM*. Mutaciones en este gen producen la ataxia telangiectasia, una inmunodeficiencia que presenta: ataxia cerebelar progresiva, sensibilidad a la radiación, defectos en los puntos de control del ciclo celular y predisposición a cáncer. Las células con mutaciones en el gen *ATM* también son deficientes en arrestar el ciclo celular en fase G1 y en algunos modos de reparación al ADN. Las células con el gen *ATM* mutado no son tan eficientes para arrestar el ciclo celular en G1 o S cuando hay daño al ADN inducido por radiación, esto se debe a que no se activa p53, como debería ocurrir normalmente, sugiriendo que ATM puede participar en la misma vía de señalización que p53. Esta proteína y su similar, la proteína ATR (codificada por el gen *ATR*) pueden unirse a p53 y fosforilarlo en su extremo amino. La proteína p53 regula la actividad cinasa de la proteína ATM, contribuyendo a la activación y estabilización de p53 en respuesta al daño al ADN inducido por radiación, por agentes químicos y en ocasiones por enzimas propias, como las topoisomerasas.

iv) Longitud de los telómeros. La longitud de los telómeros también determina que una célula se pueda dividir. Las células humanas normales sólo pueden dividirse un número determinado de veces (de 50 a 60 veces), tanto *in vitro* como *in vivo*. El número de veces que una célula puede cursar el ciclo celular está determinado, en parte por la actividad de la telomerasa. Los telómeros son secuencias repetidas de



---

---

ADN, con alto contenido del nucleótido guanina, localizadas en los extremos de los cromosomas. Los telómeros son necesarios para iniciar la replicación de esta región y, también, para evitar la recombinación y degradación de los cromosomas. Los telómeros se pueden acortar si no hay telomerasa que pueda sintetizarlos y así mantener su longitud. Cuando en una célula ya no hay actividad de telomerasa, los telómeros se pierden y la célula ya no puede dividirse, fase conocida como senescencia celular. Al perderse los telómeros se presenta inestabilidad genética, los cromosomas ya no están protegidos de su degradación en los extremos y son susceptibles de sufrir recombinación. Este arresto del ciclo celular causado por el acortamiento de los telómeros es dependiente de p53, ya que el acortamiento de los telómeros está asociado a cortes al ADN (Holland y Frej, 2000)

v) Otras señales que regulan el ciclo celular. Se ha descrito que las hormonas esteroides también pueden ejercer control sobre el ciclo celular y, a diferencia de los factores de crecimiento proteicos, estas hormonas pueden translocarse hasta el núcleo y activar la expresión de determinados genes. El ciclo celular también puede regularse mediante inhibición por contacto y factores antimitóticos extracelulares que pueden inducir la expresión de p27, p16 y p15 (Harper y Brooks, 2005).

En el cáncer, se presentan alteraciones, en al menos una de las vías que regulan la proliferación celular, y en algunos casos, la terapia está dirigida a controlar dichas vías con el fin de inhibir la proliferación.

#### **4. TERAPIA DEL CÁNCER.**

El tratamiento del cáncer varía según el tipo y estado del cáncer. Hoy en día, existen diferentes tratamientos, los cuales dependen del tipo de cáncer. Los tratamientos más frecuentemente utilizados son: cirugía, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y terapia con enzimas. A



---

---

continuación, se discutirá en general cada uno de tratamientos mencionados. En particular nos enfocaremos a la quimioterapia, debido a que, en esta tesis se evaluó un compuesto con actividad citotóxica.

#### **4.1. Cirugía.**

La cirugía es uno de los tratamientos empleados en el tratamiento del cáncer y es considerado el único tratamiento que puede curar a los pacientes con dicha enfermedad, cuando se pueden eliminar quirúrgicamente y no se ha diseminado. El tratamiento del cáncer ha cambiado drásticamente con el paso del tiempo. Avances en las técnicas quirúrgicas y un mejor conocimiento de los patrones de distribución de diferentes cánceres ha permitido a los cirujanos la resección exitosa de los tumores, sin embargo, en algunos casos la mala resección ocasiona la diseminación de las células neoplásicas a otros órganos o tejidos, proceso conocido como metástasis. Para realizar la cirugía es necesario que el cirujano esté familiarizado con la historia natural de los tipos de cáncer, y con los principios y potencialidades de la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, inmunoterapia y otras modalidades nuevas de tratamiento. Esta terapia no puede usarse para tratar cánceres como leucemias o mielomas (Devita, et al., 2001).

#### **4.2. Radioterapia.**

La radioterapia es otra manera de tratar el cáncer. Consiste en administrar dosis de radiación en esquemas tales que maten a las células del cáncer y preserven la función de los tejidos normales. Las formas más comunes de administrar la radioterapia son la braquiterapia, en la que la fuente de radiación se coloca en la proximidad o dentro del tumor, y la teleterapia, en la que la fuente de radiación se halla a determinada distancia del enfermo. El efecto biológico de las radiaciones ionizantes depende de la dosis, la frecuencia del tratamiento y del tipo celular o tejido que es irradiado. Ciertos tipos de tumores, como seminomas y linfomas, responden bien a la radioterapia, mientras que otros, como melanomas y glioblastomas, son relativamente resistentes a este tratamiento.



---

---

La radiación administrada puede ser de rayos gamma o rayos X (Holland y Frei, 2000). El daño a las moléculas biológicas por radiación se da de modo indirecto, la energía absorbida ocasiona el desprendimiento de electrones en los niveles externos de los átomos, los cuales ionizan a otras moléculas conduciendo a una cadena de reacciones complejas que terminan hasta que la energía se haya disipado. En este proceso se generan radicales libres, los cuales son muy reactivos y pueden oxidar o reducir moléculas biológicas, además pueden romper enlaces químicos. Las radiaciones ionizantes son particularmente efectivas en producir daños irreparables en el ADN, siendo éste el principal modo por el cual la radioterapia ejerce su efecto nocivo (Alison, 2002).

### **4.3. Quimioterapia.**

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

La quimioterapia es uno de los tratamientos de primera elección para algunos tipos de cáncer y en algunos otros se emplea en combinación con radioterapia, cirugía o inmunoterapia. El objetivo principal de los compuestos usados en la clínica contra el cáncer es inducir muerte a las células neoplásicas, inhibiendo en algunos casos procesos relacionados al ciclo celular. Los compuestos empleados en la quimioterapia pueden inicialmente detener la división celular (citostáticos) y posteriormente inducir la muerte celular (citotóxicos; Avendaño y Menéndez, 2008). La mayoría de los agentes antitumorales son transportados por el torrente circulatorio y no pueden pasar a través de la barrera hematoencefálica, excluyendo al cerebro de su efecto (Baquiran y Gallagher, 2001).



---

---

Uno de los problemas en la quimioterapia es que la mayoría de los compuestos contra el cáncer se administran en concentraciones altas, para que, por efecto de su distribución lleguen a concentraciones óptimas a los tumores, pero presentan toxicidad ya que no son específicos. En este sentido se han usado profármacos que son selectivamente activados en los tejidos neoplásicos, aprovechando propiedades de estas células como expresión selectiva de enzimas, hipoxia y bajo pH extracelular. Otro problema en la quimioterapia del cáncer es la resistencia a los fármacos administrados debida a proteínas transportadoras en la membrana dependientes de ATP, conocidas como proteínas MDR (del inglés multidrug resistance), que se encargan de sacar de la célula los compuestos antitumorales. Además, se ha observado que después de que se ha desarrollado un mecanismo de resistencia a un fármaco antitumoral, es posible que se presente resistencia cruzada con otros compuestos.

Existen diversas formas de clasificar a los fármacos contra el cáncer. Una de ellas es con base a su modo de acción, dependiendo de que una célula haya iniciado el proceso de división celular o no y de la fase del ciclo celular en la que éstos fármacos actúan, aunque es posible que un fármaco pueda tener más de un modo de acción (Baquiran y Gallagher, 2001), a continuación, se describen algunos de estos.

#### **4.3.1 Agentes activos durante la división celular.**

Dado que las células no se dividen al mismo tiempo, los agentes activos durante la división celular se administran en varias dosis o en una infusión continua para inducir la muerte de las células neoplásicas cuando entran en determinada fase del ciclo celular (Baquiran y Gallagher, 2001).

##### **Antimetabolitos.**

Los antimetabolitos son compuestos que están estructuralmente relacionados a compuestos que se encuentran en la célula, como: vitaminas, bases púricas y pirimídicas o aminoácidos. En general, los antimetabolitos interactúan con



---

---

enzimas compitiendo con los metabolitos por la ocupación del sitio catalítico en una enzima o se incorporan a los ácidos nucleicos, bloqueando su síntesis. Esto activa señales de muerte celular programada (MCP) en la célula (Skeel, 2007; Avendaño y Menéndez, 2008). La mayoría de los antimetabolitos tienen su actividad durante la fase S del ciclo celular, como los análogos de las bases púricas y pirimídicas. Los antimetabolitos se caracterizan por un umbral de concentración, por debajo del cual no son citotóxicos sin importar el tiempo de exposición, pero la concentración necesaria para su citotoxicidad disminuye con la duración de la exposición (Baquiran y Gallagher, 2001; Alison, 2002; Skeel, 2007).

Entre estos fármacos se encuentran: i) Los análogos de ácido fólico. El representante de estos es el metotroxate. Este compuesto inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa bloqueando la síntesis de timidina. Raltrexed (Tomudex®) que es una quinazolina antifolatos que inhibe la timidilato sintasa. Pemexetreb que es una pirrolo-pirimidina antifolato que inhibe a la dihidrofolato reductasa, timidilato sintasa y la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (Skeel, 2007). ii) Análogos de pirimidina. Estos son necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y pueden incorporarse tanto al ADN como al ARN (Skeel, 2007). En esta categoría se encuentran el fluorouracilo, la citosina arabinosido, 5-azacitidina y el 2', 2'-difluoro-2'-deoxicidina (Holland y Frei, 2000). iii) Análogos de purinas. Se ha demostrado que los análogos de purinas interfieren con la interconversión de purinas. Algunos análogos de purina también se incorporan a los ácidos nucleicos (Skeel, 2007). La principal característica química es el reemplazo isostérico del oxígeno, carbón o nitrógeno en el anillo de purina. El primer agente empleado fue la 6-mercaptopurina, en la cual el grupo 6-hidoxi de la hipoxantina es sustituido por un grupo tiol, como en el caso de la azatioprina y tioguanina. Otros análogos de purina son el aciclovir y ganciclovir, que son nucleósidos no cíclicos con importantes propiedades antivirales. Estos agentes son activados por reacciones de fosforilación, pero ellos ejercen sus efectos del mismo modo que los análogos de purina. No obstante, su uso en la terapia del cáncer aun no se ha establecido (Holland y Frei, 2000).



---

---

### **Agentes que actúan sobre microtúbulos.**

Estos compuestos tienen como blanco las proteínas que forman los microtúbulos, induciendo un arresto del ciclo celular en la metafase mitótica, inhibiendo la mitosis y, por tanto, la división celular. El correcto ensamblado de los microtúbulos y su posterior despolimerización son indispensables para la división, ya que permite a la célula separar las cromátidas hermanas a polos opuestos durante la mitosis.

Este tipo de compuestos pueden dividirse en agentes estabilizantes y agentes desestabilizantes de microtúbulos (Baquiran y Gallagher, 2001). i) Agentes estabilizantes de microtúbulos. Estos compuestos se unen a los monómeros de tubulina induciendo su polimerización y estabilizan los microtúbulos ya formados evitando su despolimerización. Entre ellos se encuentran los taxanos: taxol (Paclitaxel®), taxotere (Docetaxel®). ii) Agentes desestabilizantes de microtúbulos. Estos compuestos se unen a los microtúbulos e inducen el desmantelamiento del huso mitótico. Dentro de esta categoría encontramos a los alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), así como sus análogos semisintéticos (vindesina y vinorelbina). A altas concentraciones los alcaloides de la vinca, pueden interferir con la síntesis de ARN y de proteínas (Baquiran y Gallagher, 2001).

### **Inhibidores de las topoisomerasas.**

Las topoisomerasas participan en la relajación y superenrollamiento del ADN induciendo cortes transitorios de la cadena de ADN. Existen dos tipos de topoisomerasas en los eucariontes, cada una con isoformas. Las topoisomerasas de tipo I cortan en una hebra del ADN, mientras que las topoisomerasas de tipo II cortan ambas hebras del ADN. Los compuestos que inhiben a las topoisomerasas pueden intercalarse en el ADN perpendicularmente a la cadena de ADN entre las bases que lo forman. Otros compuestos pueden unirse a regiones cercanas al sitio activo de la enzima. Los compuestos que pueden inhibir a la topoisomerasa I están representados por los derivados de la campotecina como el irinotecan y topotecan. Entre los compuestos que pueden inhibir a la topoisomerasa II se



---

---

encuentran la 9-anilino acridinas como la amsacrina, las antraciclina, las epipodofilotoxinas (etoposido y teniposido), mitoxantrona y antrapirazoles (Pommier, et al., 1996). Algunos compuestos como las antraciclina y la actinomicina D presentan estructuras planas con propiedades hidrofóbicas, lo que les permite intercalarse en el ADN ocasionando una ligera torsión de las bases adyacentes. También, compuestos que no se intercalan en el ADN pueden inhibir topoisomerasas, como el caso de Hoechst 33358 el cual se aloja en el surco menor del ADN, inhibiendo a la topoisomerasa I (Chen, et al., 1993).

#### **4.3.2 Agentes activos no dependientes del ciclo celular.**

La actividad de estos fármacos no está limitada por la fase del ciclo celular en la que se encuentren las células tratadas. Dichos fármacos actúan directamente sobre el ADN y no muestran especificidad por las células que se encuentran en división. En general, son mas tóxicos que los fármacos que actúan durante el ciclo celular, ya que no distinguen entre células normales y células neoplásicas, con una división celular activa (Baquiran y Gallagher, 2001).

#### **Fármacos que reaccionan con el ADN.**

Cambios en la estructura superhelicoidal del ADN se transducen en señales que determinan que la célula sobreviva o muera. Cuando el ADN se daña, esas señales le indican a la célula que debe activar mecanismos de reparación antes de continuar con la síntesis y prevenir que se transmitan mutaciones a las células hijas y, con ello, comprometer su existencia. Los fármacos que interactúan con el ADN afectan al ciclo celular. El que la célula sobreviva o muera depende de la medida de las interacciones del fármaco con el ADN y que tan rápidamente los efectos adversos de dichas interacciones superen la reparación del ADN (Alison, 2002).

Dentro de esta categoría se encuentran: **i) Agentes alquilantes.** Los agentes alquilantes fueron de los primeros compuestos no hormonales con gran eficacia en el tratamiento del cáncer. Debido a su gran reactividad química, estos compuestos



---

---

pueden reaccionar con muchas moléculas biológicas. Los agentes alquilantes pueden unirse covalentemente con macromoléculas que tienen centros nucleofílicos como átomos de azufre en proteínas y nitrógeno del ADN. El efecto antitumoral inicial parece ser la inhibición de la síntesis del ADN y la división celular. Los agentes alquilantes bifuncionales pueden unir covalentemente dos sitios nucleofílicos en diferentes bases del ADN induciendo entrecruzamiento en la misma cadena o en diferentes cadenas del ADN. Los agentes alquilantes clásicos interactúan con el ADN normalmente en la posición N7 de la guanina.

Independientemente del mecanismo involucrado en la formación de los aductos, el efecto final es la inhibición de la replicación y, en su momento, puede afectar la transcripción y consecuentemente la síntesis de proteínas (Holland y Frei, 2000).

**ii) Mostazas nitrogenadas.** Estos compuestos generan iones de carbono cargados positivamente (iones carbonio) que reaccionan con moléculas ricas en electrones o con dobles enlaces, presentes en las bases nitrogenadas de ADN y otras moléculas. Algunos son altamente reactivos e inestables en soluciones acuosas como la mecloretamina. Otros han sido diseñados para ser activados en el interior de las células hepáticas, como es el caso de la ciclofosfamida (Holland y Frei, 2000). **iii) Nitrosoureas.** Las nitrosoureas son activadas rápidamente en solución acuosa a productos capaces de alquilar. Dentro de los agentes alquilantes, estos compuestos son los únicos que no presentan resistencia cruzada con otros agentes alquilantes. En esta categoría se encuentra la carmustina (BCNU) y la lomustina (CCNU). **iv) Derivados de etileniminas.** Estos son capaces de reaccionar de modo similar a las mostazas nitrogenadas. El único derivado de uso clínico es la tiotepa (trietilentiófosforamida). **v) Alquil sulfonatos.** Los derivados de estos han mostrado que son capaces de interactuar con los grupos tiol en el interior de las células. El único compuesto activo de uso clínico es el busulfan. **vi) Triazinas.** La dacarbazina es el único agente de este tipo. Originalmente se había agrupado con los antimetabolitos, ahora se sabe que puede actuar como un agente alquilante. **vii) Sales de metales.** Estos compuestos son complejos de platino con ligandos que pueden ser desplazados



---

---

por nucleófilos para formar enlaces covalentes. En esta categoría se encuentran el cisplatino, carboplatino y oxiplatino (Holland y Frei, 2000; Skeel, 2007).

#### **Antibióticos con actividad antitumoral.**

Su uso data desde 1930 con compuestos coloridos extraídos de cultivos de *Streptomyces* y continuó con el diseño de nuevos compuestos semisintéticos y sintéticos. Estos fármacos pueden intercalarse en el ADN, unirse al ARN, proteínas y lípidos; interfiriendo directamente con la síntesis de ADN, transcripción y traducción e inhibiendo actividades enzimáticas y el funcionamiento adecuado de la membrana celular. El mecanismo por el cual las antraciclinas ejercen su acción antitumoral es múltiple y complejo. Algunos compuestos interactúan con la topoisomerasa II, tanto en células procariotas como en las eucariotas (Avendaño y Menéndez, 2008). Además generan especies reactivas de oxígeno como consecuencia de las reacciones redox en el anillo de la quinona o en el anillo base de las antraciclinas, que pueden causar cortes al ADN de cadenas sencilla o doble y daño a las membranas celulares. Las antraciclinas no exhiben una especificidad por alguna fase del ciclo celular, sin embargo, las células que se encuentran en un crecimiento exponencial son más susceptibles al efecto antitumoral de la doxorubicina y la daunorubicina que las células en fase de meseta (Alison, 2002). En esta categoría se encuentra la actinomicina D, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitomicina C, mitoxantrona, plicamicina (Alison, 2002; Baquiran y Gallagher, 2001).

#### **4.3.3 Toxicidad de la quimioterapia del cáncer.**

En la quimioterapia como en el tratamiento con otros medicamentos, se pueden presentar efectos no deseables (efectos secundarios). Aunque los agentes contra el cáncer presenten cierta especificidad, ellos no pueden discriminar entre células neoplásicas y células normales. Al mismo tiempo que se eliminan las células neoplásicas, también se ven afectadas las células normales de rápida proliferación como las células de la médula, las espermatogonias, células epiteliales de la cripta gastrointestinal, entre otras. Algunos síntomas son reversibles y otros son



---

---

irreversibles, como en el caso del daño a las espermatogonias en el tratamiento con agentes alquilantes pueden conducir a una esterilidad masculina (Baquiran y Gallagher, 2001).

En el tratamiento con quimioterapia puede presentarse cardiotoxicidad (arritimias, falla congestiva del corazón e isquemia) después de un trasplante de médula ósea y del uso de factores estimulantes de colonias, este daño puede llegar a ser irreversible. La toxicidad cutánea puede afectar la pérdida de fluidos del cuerpo, alterar la regulación de la temperatura corporal, disminuir las sensaciones de dolor y el tacto, teniendo gran impacto en como el paciente percibe su alrededor. La hepatotoxicidad puede presentarse como: enfermedad veno-oclusiva, fibrosis crónica, colestasis y disfunción hepatocelular, conduciendo a una aumento de enzimas hepáticas y bilirrubina, hiperpigmentación de la piel, hepatomegalia, ascitis, letargia, anorexia y nausea.

Uno de los problemas de la quimioterapia del cáncer con un efecto más negativo en los pacientes es la pérdida de pelo (alopecia), la caída de pelo puede ser mínima (<25%), moderada (de 25-50%) o severa (>50%) dependiendo del fármaco o combinaciones, puede iniciarse después de la segunda semana y tarda de 3 a 5 meses después del tratamiento en volver a crecer. También, puede presentarse eritema de extremidades (síndrome de manos y pies), hiperpigmentación de la piel y uñas, alta sensibilidad a quemaduras por el sol (fotosensibilidad), diarrea, anorexia, alta producción de moco en las distintas membranas mucosas (mucositis), mielosupresión, anemia, neutropenia, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, toxicidad pulmonar, malformaciones fetales (teratogénesis) y mutagénesis (Baquiran y Gallagher, 2001).

#### **4.4 Hormonas y antagonistas de hormonas.**

Este es un tratamiento paliativo eficaz en cánceres dependientes de hormonas. Pueden dividirse en hormonas y antagonistas de hormonas (antihormonas) que tienen efectos benéficos en la terapia del cáncer. Algunas hormonas afectan el



---

---

ambiente celular, alterando la permeabilidad de su membrana, de manera que afectan la proliferación. Estos fármacos son hormonales o agentes parecidos a hormonas que inhiben la proliferación neoplásica, bloqueando o antagonizando sustancias que estimulan la proliferación neoplásica de modo natural (Alison, 2002). En esta categoría se encuentran: andrógenos (proprionato de testosterona, metiltestosterona, fluoximesterona), antiandrógenos (flutamida), antiestrógenos (tamoxifen), inhibidores de la aromataasa (aminoglutetimida), estrógenos: (dietilestilbestrol, estradiol), glucocorticoides (prednisona, hidrocortisona, dexametasona), inhibidores de la gonadotropina (leuprolido, goserelin), progestinas (acetato de megestrol; Skeel, 2007).

#### **4.5 Inmunoterapia.**

En la inmunoterapia del cáncer se administran agentes inmunológicos que inducen o promueven la respuesta inmune antitumoral del paciente. La inmunoterapia se divide en activa y pasiva. La primera actúa por estimulación de la inmunidad antitumoral del huésped, ya sea celular o humoral. Este efecto se puede conseguir de forma específica, mediante vacunas antitumorales o inespecífica, con sustancias como BCG, levamisol, *Corynebacterium*. La inmunoterapia pasiva consiste en la administración de agentes biológicos activos con propiedades antitumorales, como los anticuerpos. En la inmunoterapia del cáncer se emplean vacunas, interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interleucina (IL-2), Factor de necrosis tumoral (TNF), anticuerpos monoclonales (Cetuximab), entre otros (Estapé y González, 1995).

En las vacunas contra el cáncer se administran células neoplásicas atenuadas, sus lisados o antígenos tumorales purificados, para estimular el sistema inmune del paciente. La inmunoterapia activa con vacunas, cambia el ambiente neoplásico y promueve la destrucción de las células neoplásicas, activando una a respuesta tanto humoral, como celular. Los anticuerpos tienen la particularidad de ser específicos para un tipo cáncer, y la eliminación de las células neoplásicas está mediada por el complemento o por citotoxicidad dependiente de células (Holland y Frei, 2000).



---

---

#### **4.6 Terapia con enzimas.**

El crecimiento de las células neoplásicas y normales depende de la disponibilidad de nutrientes específicos y cofactores necesarios para la síntesis de proteínas. Algunos nutrientes pueden ser sintetizados dentro de la célula, mientras que otros no, por ejemplo los aminoácidos esenciales provienen de fuentes externas. La capacidad de síntesis de asparagina está notablemente reducida en células neoplásicas de origen linfóide. La asparaginasa cataliza la conversión de L-asparagina a ácido aspártico y amoníaco. Esta última enzima no entra en las células por lo que sólo puede degradar la asparagina circulante necesaria para la proliferación de las células tumorales (Ellis y Swain, 1996; Skeel, 2007).

El objetivo de la radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y terapia con enzimas, es inducir la muerte en las células neoplásicas, ya que algunos cánceres no se pueden eliminar mediante intervención quirúrgica. También, pueden emplearse en combinación para aumentar la eficiencia del tratamiento contra el cáncer.

### **5. MUERTE CELULAR.**

El tamaño y la forma de un organismo pluricelular están determinados por procesos de proliferación y muerte celular. También, la exposición a sustancias tóxicas y ambientes nocivos, como en el trauma, producen muerte celular. Una célula puede morir por una muerte celular programada (MCP), como en el caso del desarrollo o envejecimiento o por una muerte accidental (muerte celular no programada; Von Bernhardt, 2004).

#### **5.1 Muerte celular programada.**

Un organismo elimina las células que no le son útiles por mecanismos de muerte celular programada. Existen múltiples modos de MCP y estos mecanismos presentan diferencias entre ellos debido al propio mecanismo involucrado. En ellos se pueden inducir la expresión de genes y activar diversas vías de señalización



---

---

celular durante procesos biológicos como el desarrollo, interacción con microorganismos o en respuesta a compuestos antitumorales, entre otros.

En la MCP pueden participar varios organelos como mitocondria, lisosomas y retículo endoplásmico.

**I) La mitocondria.** La función principal de la mitocondria es la generación de energía en forma de ATP, al mismo tiempo puede participar en procesos de muerte celular. En el espacio intermembranal de la mitocondria se encuentran proteínas como citocromo C, Smac/DIABLO, u Omi que son liberadas al citoplasma cuando se produce daño a la mitocondria. Tanto Smac/DIABLO como Omi son proteínas que compiten con las caspasas por las proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP, por sus siglas en inglés).

El citocromo C en el citosol puede participar en la formación de apoptosoma (complejo con procaspasa-9, citocromo C y Apaf-1), en un proceso dependiente de dATP o ATP que conduce a la escisión de la procaspasa-9. La caspasa-9 activada en el proceso anterior puede activar a las procaspasa-3 y 7, las cuales en su forma activa son denominadas caspasas ejecutoras. Las caspasas ejecutoras son responsables del corte de otras proteínas que producen las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis.

Un daño a la mitocondria (por un aumento en la concentración de calcio o por radicales libres), permite que el citocromo C dissociado de la membrana interna atraviese la membrana externa a través de canales posiblemente formados por la combinación de Bid y Bax, conduciendo a la activación de las caspasas ejecutoras.

**II) Los lisosomas.** La permeabilización de la membrana lisosomal conduce a la liberación de proteínas de su interior, entre estas proteínas se encuentran las catepsinas B y L (proteasas de cisteína) y la catepsina D (proteasa de aspartato).



---

---

Esta liberación es ocasionada por un daño mediado por especies reactivas de oxígeno o por la acumulación de la esfingosina (detergente lisosomotrópico). Una permeabilidad parcial conduce a una muerte de tipo apoptótico, mientras que una permeabilidad elevada conduce a una necrosis. Algunos reportes han sugerido que la liberación de catepsinas puede actuar activando caspasas. Además catepsina D puede llevar a la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF).

**III) El retículo endoplásmico (RE).** Es un organelo sensor de estrés celular importante que puede inhibir la síntesis proteica. Si se presenta un daño en el RE se puede desencadenar la apoptosis, como respuesta a proteínas mal plegadas o a una liberación de calcio al citosol. El aumento de la concentración de calcio en el citosol conduce a la activación de otras proteasas activadas por calcio, denominadas calpaínas. Concentraciones bajas o moderadas de calcio (200-400 nM) pueden activar la apoptosis, mientras que concentraciones mayores a 1  $\mu\text{M}$  se asocian a necrosis (Bröker, et al., 2005).

En la actualidad, existe discrepancia entre investigadores, en cuanto al modo de nombrar a los distintos mecanismos de muerte celular. A continuación, se menciona los mecanismo de muerte celular mejor estudiados, tomando en cuenta recomendaciones del *Comité de nomenclatura en muerte celular (NCCD*, por sus siglas en inglés) formado por editores de la publicación científica *Cell Death and Differentiation*. Al evaluar un mecanismo de muerte celular hay que tener presente que en la eliminación de células puede participar más de un programa de muerte celular (Kroemer, et al., 2005).

### **5.1.1 Apoptosis o muerte celular tipo I.**

Frecuentemente se emplea apoptosis como sinónimo de muerte celular programada, sin embargo la apoptosis es sólo un tipo de muerte celular programada. El término apoptosis fue introducido por Kerr para describir características morfológicas de la muerte de las células. Dentro de estas se encuentran el redondeamiento transitorio de la célula, reducción del volumen



---

---

celular, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación del núcleo (cariorexis), lisis del núcleo (cariolisis), poca o ninguna modificación de los organelos, formación de protuberancias en la membrana plasmática que son las precursoras de cuerpos apoptóticos. Es un proceso activo (dependiente de energía) de desmantelamiento celular y, dado que no hay liberación de contenido citoplasmático, no se produce inflamación en los tejidos donde ocurre (Kerr, et al., 1972; Kroemer, et al., 2005).

Dentro de las características observadas por análisis bioquímicos están la fragmentación de ADN en escalera, aunque también puede ocurrir apoptosis sin fragmentación oligonucleosomal. Es promovida por un grupo de proteasas de cisteína-aspartato conocidas como caspasas. En ensayos con inhibidores de caspasas se ha encontrado también que las células pueden morir por apoptosis, no obstante la activación de las caspasas es necesaria para la adquisición de la morfología apoptótica. Sin embargo, la evaluación de la fragmentación de ADN o la activación de caspasas son útiles para determinar la apoptosis. La apoptosis puede asociarse o no a la activación de caspasas (Kroemer, et al., 2005).

La apoptosis es un proceso fisiológico normal, que se lleva a cabo durante el desarrollo, recambio de los epitelios de revestimiento y homeostasis de numerosos órganos. Además de su papel fisiológico normal, la apoptosis es un mecanismo importante por el cual compuestos antitumorales ejercen su efecto (Kim, et al., 2002; Bamford, et al., 2000, Kerr, et al., 1994) en células neoplásicas, como cáncer de próstata, pulmón, mama y colón, entre otras. Cuando éstas son sometidas a tratamientos, tales como irradiación, hormonal y/o a una variedad de compuestos quimioterapéuticos, incluyendo inhibidores de los microtúbulos, de la síntesis de ADN, o de la topoisomerasa, (Yang, et al., 1996, Merchant, et al., 1996). Numerosos trabajos reportados en la literatura han señalado que los fármacos tales como taxol, vinblastina, taxol, etoposido (McCloskey, et al., 1996), ara-C, adriamicina, compuestos antitumorales de origen natural (Ye, et al., 1998), al igual que algunas acridinas inducen la muerte de las células neoplásicas a

---

---

través de un programa de muerte celular programado o apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro* (Kaufmann y Earnshaw, 2000; Kim, et al., 2001; Makin y Hickman, 2000). Resultados publicados previamente en el caso de m-AMSA han demostrado que aumenta la ruptura de ADN vía la ADN topoisomerasa II, produciendo apoptosis (Oestergaard, et al., 2004).

Se ha descrito que las células incapaces de experimentar la apoptosis pueden ser más susceptibles a la acumulación de alteraciones genéticas que las células normales (Bargou, et al., 1995). Este es uno de los mecanismos involucrados en la progresión del cáncer y en la resistencia de los tumores a la quimioterapia o radioterapia (Sierra, et al., 1998). La apoptosis puede presentarse casi en todos los tumores malignos sin tratamiento o durante el tratamiento con agentes genotóxicos que dañan el ADN usados frecuentemente en la terapia del cáncer, u otros agentes (Sumantran, et al., 1995; Lieberman, et al., 1995).

### **5.1.2 Autofagia o muerte celular tipo II.**

Es un proceso de autodigestión, en el cual los lisosomas se encargan de eliminar principalmente organelos dañados. La autofagia se inicia cuando parte del citosol u organelos se interna en vacuolas de doble membrana conocidas como autofagosomas. La formación de estas vacuolas está bajo el control de GTPasas y cinasas de fosfatidil inositol, también participan sistemas de conjugación similares al de ubiquitinación. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas en un proceso dirigido por los microtúbulos, para finalmente degradar su contenido. En este tipo de muerte se produce una mínima o nula condensación de la cromatina. Las células que entraron en autofagia pueden ser fagocitadas por células vecinas (Fink y Cookson, 2005; Bröker, et al., 2005). La autofagia puede ser estimulada por varias situaciones de estrés, incluyendo la disminución de nutrientes. En situaciones como en la disminución de nutrientes, proporciona nutrientes que permite sobrevivir a células vecinas.



---

---

La autofagia o muerte celular programada tipo II es diferente de la apoptosis o muerte celular programada tipo I, sin embargo, la relación entre la autofagia y la apoptosis es compleja, ya que la autofagia no sólo es capaz de colaborar con la apoptosis para producir muerte celular, si no que también puede ser un mecanismo que le ayuda a las células a sobrevivir (Codogno y Meijer, 2005; Kroemer, et al., 2005; Bröker, et al., 2005).

### **5.1.3 Paraptosis.**

La paraptosis es un tipo de muerte celular programada en la que hay un aumento de volumen de la mitocondria y del RE. Esta muerte es independiente de caspasas y, por lo tanto, no se bloquea con inhibidores de caspasas, no se forman cuerpos apoptóticos, ni se observan características de la apoptosis. Puede ser activada por miembros de la familia TNF y por el receptor del factor de crecimiento tipo insulina y es mediada por la proteína cinasa activada por mitógenos MAPK (Bröker, et al., 2005).

### **5.1.4 Catástrofe mitótica.**

Es un tipo de muerte celular que ocurre durante la mitosis o procesos que la desregulan. Puede estar acompañada de alteraciones morfológicas como la formación de micronúcleos, que contienen cromosomas o fragmentos de cromosomas que no se distribuyeron correctamente a las células hijas. También, puede presentarse multinucleación, donde hay dos o más núcleos con tamaños aproximadamente similares resultado de una separación deficiente durante la citocinesis. Se ha sugerido el cambio de muerte por catástrofe mitótica por el de muerte precedida a multinucleación o muerte celular en metafase (Kroemer, et al., 2005). La catástrofe mitótica puede ser activada por agentes que estabilicen o desestabilicen los microtúbulos y por agentes que dañen al ADN. Este mecanismo de muerte elimina células cerca o durante la metafase en un modo independiente de p53 o de modo parcialmente dependiente de p53 después de que falló la mitosis por activación del punto de control de ploidía (Bröker, et al., 2005).



---

---

### **5.1.5 Anoikis.**

Es un tipo de apoptosis en la que las células pierden su adhesión a la matriz extracelular o a otras células. Se ha reconocido como un tipo de muerte celular y se encuentra ampliamente difundido en la literatura. Sin embargo, es importante profundizar sobre las circunstancias en la que se presenta la anoikis, ya que las células se pueden desprender en varios tipos de muerte (Kroemer, et al., 2005).

### **5.1.6 Exocitotoxicidad.**

Es una forma de muerte celular que ocurre en neuronas cuando se produce la apertura de canales de calcio, mediado por aminoácidos excitadores como el glutamato. La apertura de estos canales conduce a un incremento en la concentración de calcio intracelular y a la muerte (Kroemer, et al., 2005).

### **5.2 Muerte celular accidental: oncosis o necrosis.**

La oncosis es un tipo de muerte celular que no presenta signos característicos de apoptosis o de autofagia. El término oncosis deriva del griego onkos que significa hinchado, es un tipo de muerte celular en la que el citoplasma aumenta de volumen, hay una ruptura mecánica de la membrana plasmática, se dilatan los organelos celulares, existe una rápida pérdida de los potenciales de membrana, también puede presentarse moderada condensación de la cromatina. Es un tipo de muerte celular que se considera no programada y ocurre como respuesta a daño celular por efecto hipoxia, traumatismo, sustancias químicas, agentes infecciosos, variaciones térmicas o radiaciones ionizantes, entre otros (Kroemer, et al., 2005). Es un proceso no dependiente de energía, en la que el contenido citoplásmico es liberado produciendo inflamación en los tejidos circundantes. La oncosis también puede ser causada por agentes que puedan interferir con la generación de ATP o por procesos que causen un consumo descontrolado de energía. La disminución de la función en los canales iónicos dependientes de ATP, como consecuencia de niveles bajos de energía puede conducir a la apertura de dichos canales en la membrana. Esta apertura de canales permite la entrada de cationes provocando un hinchamiento de la célula y posteriormente su lisis.



---

---

La disminución de los niveles de ATP es resultado de una disminución de nutrientes o de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno también pueden participar en la producción de muerte celular. La principal fuente de especies reactivas de oxígeno es la mitocondria. Las especies reactivas de oxígeno pueden generar enlaces cruzados entre cadenas de ADN, ADN-proteínas y oxidación de purinas. El daño al ADN puede activar respuestas mediadas por p53 y por PARP. La vía que involucra a p53 puede ocasionar un arresto al ciclo celular y en caso dado, muerte por apoptosis, mientras que la hiperactivación de PARP conduce a una necrosis. Además, en ausencia de fagocitosis los cuerpos apoptóticos pueden perder su integridad y proceder a una necrosis secundaria a la apoptosis (Fink y Cookson, 2005). En la literatura referente a muerte celular se emplea necrosis y oncosis como sinónimo. Por otro lado, los patólogos han empleado el término necrosis para denotar a las características morfológicas que ocurren después de que la célula ha muerto y alcanza el equilibrio con el tejido que lo rodea, sin importar el proceso que lo promovió. En el primer caso se habla de una muerte por oncosis o de tipo necrótico y en el segundo caso de tejido necrótico.



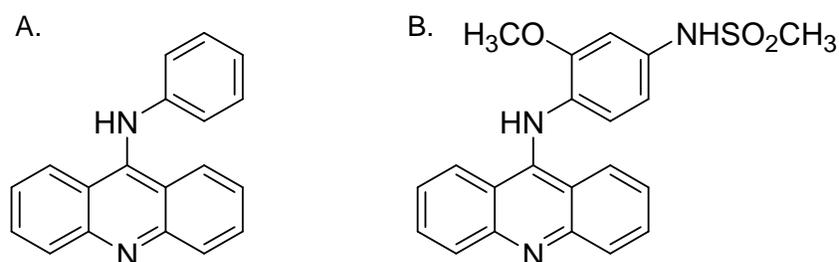
---

---

## 6. ANTECEDENTES

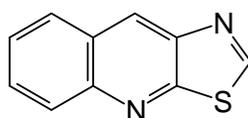
Dentro de los compuestos citotóxicos, han llamado la atención algunos derivados de la acridina. Se ha reportado, que son sustancias activas en líneas celulares de leucemia y en tumores sólidos de ratón, además de que son capaces de unirse al ADN (Su, et al., 1995).

Las acridinas citotóxicas interactúan con el ADN e inhiben la actividad de la topoisomerasa II. Este es el caso de la amsacrina (m-AMSA, figura 2), compuesto antileucémico. También, se ha reportado que algunos compuestos como las quinolinas, que están estructuralmente relacionados a las acridinas, pueden intercalarse en el ADN (Xia, et al., 1998). La intercalación en el ADN no necesariamente es un reflejo de actividad citotóxica, por ejemplo, la 9-anilinoacridina (figura 2) se intercala en el ADN pero carece de actividad citotóxica.



**Figura 2.** Estructuras de 9-anilinoacridina (A) y amsacrina (m-AMSA, B).

En 1997, Alvarez-Ibarra y colaboradores reportaron la síntesis y estudio *in vitro* de varios compuestos con una estructura base de tiazolo[5,4-b]quinolina (figura 3) como potenciales agentes antitumorales.



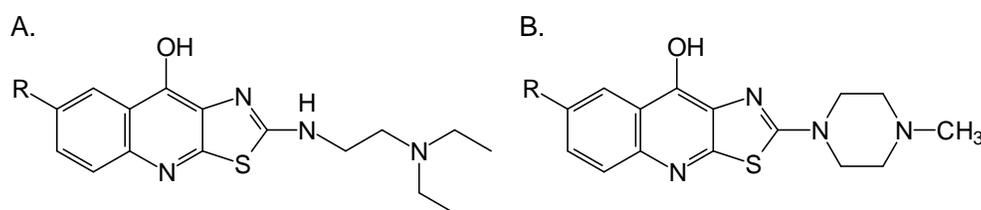
**Figura 3.** Tiazolo[5,4-b]quinolina

---

---

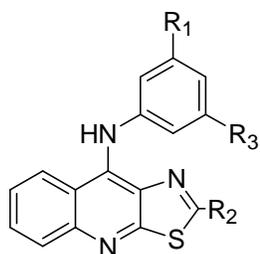
Su evaluación se realizó en diferentes líneas celulares. El compuesto 2-[[2-(N,N-dietilamino)etil]amino]-7-fluoro-9-hidroxitiazolo[5,4-b]quinolina (figura 4A, R = F) fue el más activo de toda la serie en las líneas celulares P-388 de linfoma de ratón y A-549 de pulmón humano. En este estudio se observó que la presencia de un átomo de flúor en la posición 7 o un grupo [(N,N-dietil)etil]amino en la posición 2, eran factores importantes para la inducción de una actividad citotóxica significativa.

También, se observó que la presencia de un grupo 1-(4-metilpiperazinil) en posición 2 disminuye la actividad citotóxica con respecto al derivado con un grupo [(N,N-dietil)etil]amino en la misma posición, lo cual se puede atribuir a que la rigidez del anillo de piperazina no permite una adecuada conformación de la cadena lateral para lograr la intercalación en el surco menor del ADN (Alvarez-Ibarra, et al., 1997).



**Figura 4.** Primer serie de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. R= H, Me, F. Tomado de Alvarez-Ibarra, C. et al., 1997.

Con el objetivo de obtener nuevos derivados tiazolo[5,4-b]quinolina con mayor actividad citotóxica, y apoyándose en estudios de modelado molecular, de análisis conformacional, de cálculo de propiedades electrónicas, etc., Rodríguez-Loaiza y colaboradores, en 2004 sintetizaron nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina incorporando a la posición 9 un grupo anilino con y sin sustituyentes (figura 5).



- 1**  $R_1=H$   $R_2=SCH_3$   $R_3=H$   
**2**  $R_1=H$   $R_2=NHCH_2CH_2N(CH_2CH_3)_2$   $R_3=H$   
**3**  $R_1=NH_2$   $R_2=SCH_3$   $R_3=H$   
**4**  $R_1=NHCOCH_3$   $R_2=SCH_3$   $R_3=H$   
**5**  $R_1=NH_2$   $R_2=SCH_3$   $R_3=CH_2OH$

**Figura 5.** Segunda serie de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. Tomado de Rodríguez-Loaiza, et al., 2004.

A estos compuestos se les determinó su actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales humanas: HeLa, CaLo y C-33 de cérvix, SW-480 y SW-620 de colon, MCF-7 de mama, CHO células de ovario de hámster chino y K-562 de eritroleucemia. Los resultados se resumen en la tabla 2. Además, se determinaron las propiedades intercalantes de dichos compuestos las cuales variaron de acuerdo al patrón de sustitución.

**Tabla 2.** Actividad citotóxica ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) de los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina de la segunda serie y m-AMSA como referencia, en líneas celulares tumorales humanas. Se muestra los valores de  $IC_{50}$  y su respectiva desviación estándar. La estructura para cada compuesto se indica en la figura 5.

L. celular/ Compuesto	MCF-7	HeLa	CaLo	C-33	SW-480	SW-620	CHO	K-562
1	>200	>200	198.3±15.8	153.7±7.7	>200	>200	>200	>200
2	16.6±2.7	15.96±0.3	29.9±1.5	22.4±4.2	37.7±0.8	21.6±1.8	30.6±11.1	16.8±0.5
3	74.3±19.2	176.5±30.3	128.1±25.4	138.8±23.9	>200	>200	136.8±18.2	143.4±11.5
4	132.3±28.5	>200	>200	>200	>200	153.9±28.6	58.8±2.7	85.3±10.2
5	138.5±23.4	>200	106.4±2.1	>200	>200	183.9±69.9	111.4±6.5	143.4±6.9
m-AMSA	4.1±1.2	9.5±0.6	18.3±1.5	8.8±0.5	27.7±2.0	16.7±2.8	9.3±2.7	19.9±0.8

Tomado de Rodríguez-Loaiza, et al., 2004

Algunos de estos compuestos presentan actividad citotóxica significativa, con relación a su capacidad de intercalarse en el ADN (datos no mostrados). Se observó que el compuesto 2, es el más citotóxico de la serie (tabla 2) y tiene baja afinidad por el ADN pero se incorpora en mayor proporción que los otros

---

---

compuestos al ADN; por el contrario, el compuesto 3 muestra una alta afinidad pero su incorporación es menor con relación al compuesto 2. De lo anterior, se deduce que el compuesto 3 tiene una mayor selectividad que el compuesto 2 (Rodríguez-Loaiza, et al., 2004).

Aunque estos compuestos son citotóxicos, los valores de  $IC_{50}$  son altos, por lo que, el grupo dirigido por Lira-Rocha sintetizó una tercera serie de derivados tiazolo[5,4-b]quinolina. A estos compuestos se les determinó su actividad citotóxica en diversas líneas celulares tumorales. Los compuestos más activos fueron los que presenta un grupo [(N,N-dietil)etil]amino, no obstante que dicho sustituyente se encuentre en diferentes posiciones, con valores de  $IC_{50}$  desde 9.5 hasta 28  $\mu M$ , y más de 200  $\mu M$  para algunos derivados sin dicho sustituyente. Además, presentaron una mayor intercalación en el ADN, comparada con los derivados que no tenían el sustituyente [(N,N-dietil)etil]amino (Loza-Mejía, et al., 2008)

El grupo dirigido por Lira-Rocha, ha propuesto otros sustituyentes de la estructura de tiazolo[5,4-b]quinolina, como cambiar el sustituyente [(N,N-dietil)etil]amino por [(N,N-dietil)propil]amino. Los resultados previos para la actividad citotóxica, mostraron una mayor actividad citotóxica, comparada con la serie anterior. Los compuestos B3COZET y B3KTN no tienen el sustituyente [(N,N-dietil)propil]amino, y sus  $IC_{50}$  fueron altas o no fue posible determinarlas (tabla 3; Camacho A, Molina S. et al., 2004).



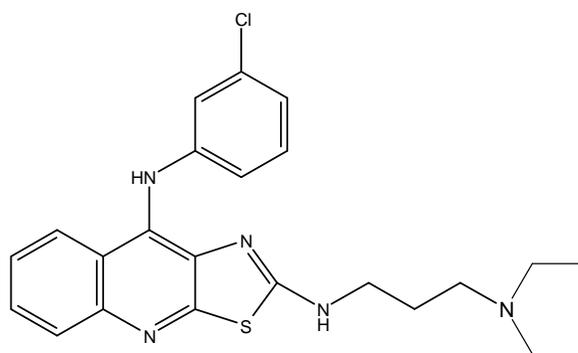
**Tabla 3.** Actividad citotóxica ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) de los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina de la cuarta serie. Se muestra los valores de  $IC_{50}$  y su desviación estándar.

Línea celular/ Compuesto	K-562	CaLo	MCF-7	HeLa	SW-480	SW-620
D3CNP	12.88±3.59	16.49±5.64	17.47±3.07	19.21±0.78	11.53±3.59	19.65±2.0X10 <sup>-3</sup>
D3CLP	7.82±0.32	12.88±12.54	9.72±3.41	7.46±1.36	7.91±2.07	10.17±2X10 <sup>-3</sup>
D4CNP	12.88±9.49	28.02±12.54	20.56±6.67	24.18±4.36	22.70±2.81	29.15±5.91
A2P	7.52±1.91	14.08±4.36	11.17±2.91	6.27±0.87	6.90±3.62	16.56±3.17
D4CLP	5.79±0.51	6.15±0.88	6.80±0.41	7.34±0.43	6.22±0.91	5.84±0.68
C92P	17.52±0.93	15.23±0.80	24.44±1.38	15.91±1.87	15.76±2.73	24.4±4.13
B3COZET	>80	>80	>80	>80	>80	>80
B3KTN	*	*	*	*	*	*

\* Indeterminado

Tomado de Camacho A, Molina S. et al., 2004.

La sensibilidad de las líneas celulares estudiadas fue diferente, siendo la más sensible la línea celular K-562 como se observa en la tabla 3, seguida de HeLa. Uno de los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina más activos fue D3CLP del cual no se ha reportado información adicional, por lo que estudiamos diversas propiedades de éste compuesto en el presente trabajo (figura 6).



**Figura 6.** Estructura química del derivado tiazolo[5,4-b]quinolina D3CLP.

---

---

## 7. JUSTIFICACIÓN.

En la quimioterapia del cáncer, tanto la resistencia a los antitumorales, como sus efectos secundarios han promovido la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales que sean una opción en el tratamiento de esta enfermedad. Desde hace años, se ha intensificado la investigación para la obtención de nuevos fármacos para ser utilizados en la clínica oncológica. Muchos de estos compuestos provienen de fuentes naturales y/o son sintetizados en el laboratorio.

La obtención de nuevos fármacos antitumorales es relevante, ya que se requieren nuevos compuestos con mejores propiedades de selectividad y efectividad contra las células neoplásicas.

Dentro de las sustancias sintéticas con actividad antitumoral potencial se encuentran compuestos tricíclicos, como los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina. En estudios previos se ha demostrado que algunos de estos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina pueden intercalarse en el ADN, pero aún no se ha descrito el tipo de muerte que inducen, ni el proceso que la activa.

Considerando lo expuesto anteriormente, en el presente estudio, se evaluó el efecto del derivado tiazolo[5,4-b]quinolina D3CLP, en el ciclo celular, inducción de la fragmentación del ADN y activación de caspasas ejecutoras en células K-562. Se analizó si el compuesto D3CLP puede intercalarse en el ADN e inhibir a la topoisomerasa II *in vitro*, así como, su citotoxicidad en células no tumorales. Lo que nos permitirá entender el mecanismo de muerte, por el cual este tipo de derivados tiazolo[5,4-b]quinolina ejercen su efecto citotóxico.



---

---

## 8. HIPÓTESIS:

El derivado tiazolo[5,4-b]quinolina *D3CLP* citotóxico podrá intercalarse en el ADN, inhibir la topoisomerasa II y conducir a una muerte celular programada en células de eritroleucemia humana K-562.

## 9. OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el mecanismo por el cual el derivado de tiazolo[5,4-b]quinolina *D3CLP* induce muerte en células de eritroleucemia humana K-562.

### 9.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el efecto de D3CLP en el ciclo celular de células K-562.
2. Analizar la fragmentación de ADN en células K-562 tratadas con D3CLP.
3. Estudiar la actividad de caspasas en células tratadas con D3CLP.
4. Evaluar la intercalación de D3CLP en el ADN *in vitro*.
5. Analizar el efecto de D3CLP sobre la actividad de la topoisomerasa II *in vitro*.
6. Evaluar la citotoxicidad de D3CLP en células no tumorales.



---

---

## 10. MATERIALES Y MÉTODOS.

### MATERIALES

#### Línea celular

Se emplearon células K-562 de eritroleucemia, provenientes de una mujer con leucemia mielógena crónica (Lozzio y Lozzio, 1979). Estas células presentan una translocación entre el cromosoma 9 y el 22, conocido como cromosoma Filadelfia (Evans, et al., 1987) y presenta la inserción de una citosina entre el codón 135 y 136 en el gen *p53*, generando un codón de término de la transcripción unas bases adelante generando un codón de paro de la transcripción. La proteína codificada es no es funcional y rápidamente degradada (Lobbert, et al., 1988; Law, et al., 1993).

#### Compuesto analizado

D3CLP

Nombre: 9-[(3-cloro)fenilamino]-2-[3-(dietilamino)propilamino]tiazolo[5,4-b]quinolina

P. M.: 439 g/mol

logP teórico: 6.18; El coeficiente de partición octanol-agua (logP) es una medida de que tan liposoluble o hidrosoluble es un compuesto. El valor calculado nos indica que D3CLP es liposoluble.

#### Medio de cultivo. Medio RPMI

Medio RPMI	10 g (1 sobre) Gibco-Invitrogene
L-Piruvato 100X	10 mL Gibco-Invitrogene
Antibiótico-antimicótico 100X	10 mL Gibco-Invitrogene
Aminoácidos no esenciales 100X	10 mL
NaHCO <sub>3</sub>	63.3 mM
HEPES	9.23 mM
Agua desionizada estéril c.b.p.	900 mL



---

---

La preparación se realizó en una campana de flujo laminar utilizando material estéril. En un vaso de precipitado (1 L) se disolvió el sobre de medio de cultivo en 700 mL de agua desionizada junto con los otros complementos sólidos usando un agitador magnético. Se adicionaron los constituyentes líquidos se agitó y se adicionó agua desionizada suficiente para completar 900 mL. Se esterilizó por filtración el medio a través de membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Se complementó con 10% de suero de bovino fetal inactivado (SFB), 100  $\mu\text{g/mL}$  de penicilina G sódica y 0.25  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomycin (GIBCO®). De igual modo, se requirió de un control de esterilidad. Los frascos se conservaron bien cerrados y en refrigeración. Para verificar su esterilidad, se colocó una alícuota del medio en una caja petri estéril y se incubó a 37 °C, por 48 horas.

### **Medio de congelación**

Medio de cultivo RPMI complementado 95%

DMSO 5%

Los componentes se homogenizaron en un tubo de centrifuga estéril y se conservaron en congelación -20 °C.

### **PBS (Solución amortiguadora de fosfatos)**

NaCl 136.89 mM

KCl 2.68 mM

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.76 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10.14 mM

Agua destilada c.b.p. 1 L

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



---

---

**PBS-EDTA** (Solución amortiguadora de fosfatos con EDTA)

NaCl	136.89 mM
KCl	2.68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.76 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.14 mM
EDTA	1 mM
Agua destilada c.b.p.	1 L

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

**Solución de MTT** (2.5 mg /mL)

Para preparar 50 mL.

MTT	125 mg
PBS c.b.p.	50 mL

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

**Solución fijadora para TUNEL** Paraformaldehído al 4%

Para preparar 50 mL

Paraformaldehído	2 g
PBS c.b.p.	50 mL

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



---

---

### **Composición de la solución amortiguadora de lisis celular**

DTT	1 mM
Tris-HCl	10 mM
Glicerol	30%
EDTA pH 8.5	1 mM
Tritón X-100	1%
PMSF	1 mM
Ortovanadato	1 mM
Azida de sodio	15 mM
Inhibidores Complete Roche	1 Tableta
H <sub>2</sub> O c.b.p.	50 mL

La solución amortiguadora conteniendo los reactivos mencionados se conservó a -20 °C hasta el momento de su uso.

### **Inhibidor de proteasas concentrado.**

Complete® Roche	1 Tableta
H <sub>2</sub> O c.b.p.	2 mL

### **Solución amortiguadora de lectura para cuantificar actividad de caspasas**

Sacarosa	10%
HEPES	10 mM
EDTA	1 mM
EGTA	20 µM
CHAPS	0.1%
DTT	10 mM
H <sub>2</sub> O c.b.p.	50 mL

La solución amortiguadora conteniendo los reactivos anteriores se conservó en congelación a -20 °C hasta el momento de su uso. Antes de usar se agregó 2 µL



---

---

del inhibidor de proteasas concentrado por cada mililitro de solución amortiguadora de lectura.

### **Solución amortiguadora de lectura para intercalación en el ADN**

Tris-HCl pH 7.4	0.1 M
NaCl	0.15 M
H <sub>2</sub> O c.b.p	200 mL

La solución amortiguadora fue esterilizada en autoclave y conservada en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### **ADN de timo de ternera**

ADN de timo de ternera	600 µg/mL
Solución amortiguadora de lectura para intercalación c.b.p.	50 mL

Esta solución se conservó en congelación a -70 °C hasta su uso.

### **Bromuro de etidio**

Bromuro de etidio	6 mM
H <sub>2</sub> O c.b.p.	10 mL

Esta solución se conservó protegida de la luz a -20 °C hasta su uso.

### **Solución amortiguadora de corrida para geles de agarosa TAE 1X**

Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Acetato de sodio	20 mM
H <sub>2</sub> O c.b.p.	1 L

Esta solución amortiguadora se conservó a temperatura ambiente hasta su uso.



---

---

## MÉTODOS

### **Mantenimiento del cultivo celular.**

Todos los procedimientos se realizaron en una campana de flujo laminar, en condiciones de esterilidad. Se utilizó material limpio y estéril en la manipulación de medio de cultivo y líneas celulares. Las células se mantuvieron en crecimiento en cajas petri de plástico estériles, con medio de cultivo RPMI complementado con 10% de suero de bovino fetal el cual se cambió cada tercer día o según se requirió. Los cultivos se incubaron en un ambiente con 5% CO<sub>2</sub>, con una humedad relativa del 98%, a 37 °C (condiciones óptimas para el cultivo celular). El cambio del medio de cultivo se realizó de la forma siguiente: ya que las células K-562 se adhieren a la caja petri, se eliminó el medio de cultivo por decantación. Las células adheridas a la caja petri se lavaron con una solución de PBS-EDTA, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de detritos, y se observaron al microscopio. Finalmente, se adicionó medio fresco y las células se volvieron a incubar.

### **Propagación de líneas celulares**

Cuando las líneas celulares llegaron a una confluencia de 90% (cantidad de células que ocupan el 90% de la superficie de la placa), se propagaron en otra caja petri para disminuir su confluencia y así evitar la saturación, para ello, se eliminó por decantación el medio de cultivo de la caja. Se lavó la superficie de células adheridas con PBS-EDTA. Se incubaron en PBS-EDTA durante 5 minutos para favorecer que las células de la monocapa se desprendieran. Las células que permanecieron adheridas se desprendieron con ayuda de una micropipeta. Posteriormente, se inoculó una caja de Petri con medio de cultivo previamente atemperado a 37 °C con las células K-562 y se distribuyeron las células con movimientos circulares suaves y posteriormente se incubaron.

### **Conteo celular**

Para el conteo celular se empleó una cámara de Neubauer (figura 7), la cual se limpió con etanol al 70%. Se tomó una alícuota de una suspensión celular,



---

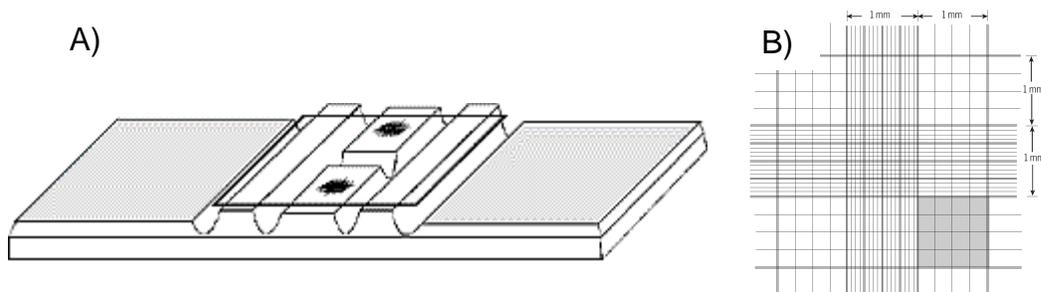
---

previamente homogenizada, como se indica en el apartado anterior y se colocó en la cámara de Neubauer. Se dejó reposar unos minutos para que las células sedimentaran, sin dejar que la muestra se seque. El conteo de las células se realizó en un microscopio invertido, contando en los cuadrantes correspondientes para la cuenta de linfocitos (área sombreada figura 7B).

La cámara de Neubauer posee dos áreas de conteo con cuatro cuadrantes. Se contó el total de células presentes en cada uno de ellos y se obtuvo el promedio de células por cuadrante. Una vez obtenido el promedio se aplicó la siguiente fórmula para calcular el número de células por mililitro.

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

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



**Figura 7.** Representación esquemática de una cámara de Neubauer. A la izquierda se muestra la cámara completa, con el cubreobjetos en su lugar (A). La cuadrícula de la derecha representa cada una de las dos áreas de conteo que tiene la cámara (B). Se contó y se calculó el promedio de células presente en cada cuadrante de las esquinas con 16 cuadros.

### **Congelación de células.**

Antes de congelar las células debían estar muy refringentes y con una confluencia del 90% al 95%. Se procedió como se indica en el apartado de propagación celular hasta obtener la suspensión celular, la cual se colectó en un tubo y se

---

---

centrifugó a 1200 rpm, durante 5 minutos El sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió con el medio de congelamiento suavemente. Se emplearon aproximadamente 4.5 mL de medio de congelación por cada caja de cultivo cosechada. Se distribuyó la suspensión en criotubos y se congelaron en posición vertical a -70 °C por 24 horas, finalmente los criotubos se conservaron a -196 °C en nitrógeno líquido por tiempo indefinido.

### **Descongelación de células.**

En un tubo de centrífuga se colocaron 5 mL de PBS calentado a una temperatura de 37 °C. Se sacó un criotubo del nitrógeno líquido y se transportó en hielo hasta la campana de flujo laminar. Las células se descongelaron frotando el criotubo con la mano, el contenido se vertió en el tubo de centrífuga y posteriormente, se mezcló por inversión. El tubo con la suspensión celular se centrifugó a 1200 RPM durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el paquete celular se resuspendió en 4 mL de medio RPMI. Esta suspensión celular en medio se colocó en una caja petri de 3 cm y se incubó como se indicó anteriormente.

### **Preparación de disoluciones de compuestos.**

Los compuestos fueron pesados y tanto el D3CLP como taxol, se disolvieron en DMSO, se calculó su concentración y se realizaron diluciones en los casos necesarios, el resto de la disolución fue conservado a 4 °C protegido de la luz.

### **Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo.**

Por citometría de flujo se analizan células separadas en suspensión, las cuales pueden estar marcadas. Mediante esta técnica se puede estudiar el contenido de ADN de células marcadas con yoduro de propidio (IP). Dependiendo del contenido de ADN es posible determinar células en fase G1 o G0 (con contenido de ADN 2n), células en fase G2 o M (con contenido de ADN 4n) y células en fase S (con contenido de ADN mayor a 2n y menor a 4n). La acumulación de toda la población en alguno de los estadios anteriores permite evidenciar arresto del ciclo celular y



---

---

la presencia de una población con contenido de ADN menor a  $2n$  corresponde a detrito celular (Hang y Fox, 2003).

Para estudiar el contenido de ADN de células con diferentes tratamientos marcadas con yoduro de propidio, mediante citometría de flujo, se sembraron células K-562, a una densidad de  $1 \times 10^6$  células, en cajas petri de 10 cm de diámetro, 24 horas antes de iniciar los diferentes tratamientos. Las células se trataron con D3CLP  $7.8 \mu\text{M}$  y se incubaron por periodos de 3, 6, 12, 24 y 48 horas, respectivamente. También, se trataron células con 0.28% de DMSO (vehículo) y taxol  $0.25 \mu\text{M}$  a los mismos tiempos de incubación. Todos los tratamientos se incubaron en condiciones óptimas para el cultivo celular. Terminado el tiempo de incubación, se colectó cada una de los tratamientos por separado en tubos inmersos en hielo. Las células adheridas se desprendieron con PBS-EDTA y se colectaron en el mismo tubo. Posteriormente, se lavó la caja petri con 1 mL de PBS frío colectándolo del mismo modo y se centrifugó a 1200 rpm, por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y en el remanente se resuspendió el paquete celular. Las células fueron fijadas por la adición de 9 mL de etanol al 70% frío y en estas condiciones se conservaron a  $4^\circ\text{C}$ , hasta el momento antes de su análisis en el citómetro de flujo.

Previo al análisis de citometría, se eliminó el etanol de cada muestra centrifugando a 1200 rpm por 5 minutos. El botón celular se lavó con 1 mL de PBS frío y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en PBS frío con 2  $\mu\text{l}$  de ribonucleasa A (RNasa A) 10 mg/mL libre de DNasa y con 200  $\mu\text{l}$  de yoduro de propidio (IP)  $50 \mu\text{g/mL}$  y tritón X-100 al 0.1%. Las muestras se incubaron por al menos una hora a temperatura ambiente en oscuridad y las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACSort®, Becton Dickinson (Hang y Fox, 2003). Los datos de al menos 20,000 eventos adquiridos se analizaron con ayuda del programa ModFitLT®.



---

---

### **Determinación de fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL.**

En el ensayo de TUNEL (del inglés, TdT-mediated dUTP nick end labeling), se marcan los extremos 3'OH del ADN *in situ*, por medio de una enzima transferasa de nucleótidos terminal (TdT). En el marcaje se pueden emplear, por ejemplo, nucleótidos marcados con fluoresceína. En procesos de muerte celular se produce fragmentación de ADN, generando extremos 3'OH susceptibles de ser marcados. El ensayo de TUNEL, además de marcar ADN fragmentado, nos permite observar otras características sugerentes de muerte por apoptosis, como condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y la presencia de cuerpos apoptóticos (Gavrieli, et al., 1992; Reed, 2000).

Para analizar la fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL, se sembraron  $5 \times 10^5$  células K-562 en cajas petri de 6 cm de diámetro 24 horas antes de iniciar los diferentes tratamientos, las cuales contenían cubreobjetos redondos de 9 mm de diámetro (laminillas). Se trataron las células con D3CLP a una concentración de 7.8  $\mu\text{M}$ , incubándose durante 3, 6, 12, 24 y 48 horas respectivamente. Del mismo modo, se trataron células con 0.28% de DMSO (vehículo), taxol 0.25  $\mu\text{M}$  y se incubaron a los tiempos antes mencionados. Todos los tratamientos se incubaron en condiciones óptimas para el cultivo celular. Terminado el tiempo de incubación, se colectó cada una de los tratamientos por separado. Las células adheridas a cada laminilla se trataron con cuidado para no desprenderlas. Cada caja fue lavada con PBS frío y se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 45 minutos. Posteriormente, se realizaron nuevamente dos lavados con PBS. Las laminillas en las cajas petri se conservaron en 1.5 mL de PBS a 4 °C hasta su procesamiento posterior.

Cuando se habían colectado todos los tratamientos se procesaron las muestras para la técnica de TUNEL empleando "In situ cell death detection kit, fluorescein®", Roche (Cat. No.11 648 795 910) y siguiendo las indicaciones para su uso. Brevemente, se tomó una laminilla de cada tratamiento y se colocó en una placa de 12 pozos. Se bloqueó cada laminilla con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en metanol durante



---

---

5 minutos. Posteriormente, se lavó dos veces con PBS. Las placas con las laminillas se colocaron sobre hielo antes de permeabilizar las células con 0.1% de tritón X-100 en citrato de sodio 0.1% durante dos minutos. Las laminillas se lavaron nuevamente con PBS. Se tomaron dos laminillas incubadas con DMSO por 12 h; una para control positivo de la técnica, la cual se trató con desoxirribonucleasa I (DNasa I) durante una hora a 37 °C, y otra a la que no se adicionó la enzima de la reacción de TUNEL (control de fondo de fluorescencia). Adicionalmente, a las demás muestras con los tratamientos se les adicionó 30 µL de la mezcla de reacción de TUNEL y se incubaron 60 minutos a 37 °C en atmósfera húmeda en oscuridad. Se realizaron lavados con PBS. Las laminillas secas se montaron en portaobjetos con *Clarion Mounting Medium*®, para su análisis por microscopía de fluorescencia. Se empleó una longitud de onda de excitación de 488nm y se detectó la fluorescencia a 520 nm (longitud de emisión, verde).

#### **Análisis de la actividad de caspasas ejecutoras.**

Las caspasas tienen un papel importante en la muerte por apoptosis, ya que su actividad produce las características morfológicas de este tipo de muerte celular. Un modo de determinar que se han activado las caspasas es evaluar su actividad *in vitro*, empleando péptidos sintéticos que al ser reconocido por una caspasa en particular, liberen una molécula que se pueda determinar por colorimetría o por fluorimetría durante un periodo de tiempo (Moran, et al., 1999; Elinos-Báez, et al., 2003).

Para analizar la actividad de caspasas, las células se trataron como se indica para citometría de flujo, hasta obtener el respectivo paquete celular sin fijar con etanol. Las células centrifugadas se resuspendieron en 1 mL de PBS frío. La suspensión celular se pasó a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el paquete celular fue conservado a -70 °C hasta el momento de su lisis. Cuando se habían colectado las muestras correspondientes a todos los tratamientos se procedió a su lisis, para lo cual a los



---

---

paquetes celulares descongelados se les adicionaron 70  $\mu$ L de solución amortiguadora de lisis. Las células se lisaron con ayuda de una micropipeta, subiendo y bajando el paquete celular. Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos, posteriormente, se centrifugaron a 12 000 rpm a 4 °C, durante 40 minutos y el sobrenadante se congeló a -70 °C, hasta el momento de utilizarse. La concentración de proteínas fue determinada mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

La actividad de caspasas ejecutoras fue evaluada por fluorometría, para lo cual se colocó en una celda de cuarzo 2.5 mL de solución amortiguadora de lectura de caspasas, 30  $\mu$ g del extracto de proteína total de la muestra a evaluar y el sustrato AcDEVD-AMC 25  $\mu$ M que al ser cortado por la caspasa-3 o 7 (caspasas ejecutoras) libera AMC, el cual es un compuesto que fluoresce. La muestra fue agitada por inversión protegida de la luz. Se realizó un seguimiento de la fluorescencia de la muestra durante 10 minutos para cada muestra en un equipo Shimadzu®, RF-5301PC, a una longitud de onda de 360 nm para excitación y a 440 nm para emisión, tomando lecturas cada 2 segundos. El aumento de la fluorescencia es proporcional a la actividad de caspasas ejecutoras en la muestra de cada tratamiento (Moran, et al., 1999; Caballero-Benítez y Morán, 2003).

### **Intercalación de D3CLP en el ADN.**

La actividad citotóxica de algunos compuestos como la anilinoacridinas, se debe a que interactúan con el ADN, intercalándose en éste. Por la técnica de desplazamiento de bromuro de etidio desde el ADN, se puede determinar si un compuesto se intercala, por la disminución de la fluorescencia debida al bromuro de etidio, al ser desplazado del ADN por un segundo agente que se intercale (Rodríguez-Loaiza, et al., 2004; Loza-Mejía, et al., 2008).

La determinación de la intercalación de D3CLP en el ADN se realizó mediante la técnica de desplazamiento de bromuro de etidio por fluorometría *in vitro*. En una celda de cuarzo se colocaron 2.4 mL de solución amortiguadora de lectura para



---

---

intercalación, 22  $\mu\text{L}$  de ADN de timo de ternera 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 6  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio 6 mM. La muestra fue agitada por inversión y se tomó una lectura inicial de fluorescencia a 584 nm, excitándola a 546 nm. Posteriormente, se realizaron nuevas lecturas de fluorescencia después de realizar adiciones del compuesto D3CLP, en los cuales la concentración del compuesto estaba entre 1 y 100  $\mu\text{M}$ . Se analizó el disolvente (DMSO) para realizar la respectiva corrección debida al efecto del disolvente. La disminución en la fluorescencia inicial es debida al desplazamiento de bromuro de etidio unido al ADN por D3CLP. La curva de desplazamiento de bromuro de etidio se analizó mediante regresión no lineal empleando el programa OriginPro 7.0® (Rodríguez-Loaiza, et al., 2004).

### **Evaluación de la relajación de ADN superenrollado.**

La topoisomerasa II produce cambios topológicos complejos del ADN mediante el corte transitorio de las dos cadenas de la doble hélice permitiendo la relajación o desencadenado del ADN, en un proceso dependiente de ATP. Durante éste proceso de ruptura y empalme, se produce un intermediario covalente entre los extremos 5' de cada una de las hebras del ADN y cada una de las subunidades enzimáticas. Algunos compuestos que se pueden intercalar a ADN también inhiben a la topoisomerasa II, generando una alta cantidad de cortes permanentes al ADN, al ser procesado por las enzimas que interactúan con él. Por otro lado, la inhibición *in vitro* de la topoisomerasa sólo bloquea el proceso de relajación del ADN superenrollado (Bonjean, et al., 1998; Fortune y Osheroff, 1999).

Para evaluar la inhibición de la topoisomerasa II *in vitro*, se empleó el kit comercial "Topoisomerase II Assay®", (TopoGen Inc., No. Cat.1001-2). En un tubo se colocaron 0.2  $\mu\text{g}$  de ADN de cinetoplasto en 20  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl 10 mM, ditiotreititol 500 nM y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de albúmina sérica bovina en presencia de 2 mM de ATP. A esta mezcla se le agregó 1 U (unidad) de topoisomerasa II $\alpha$  humana y D3CLP a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . Se tomó como control positivo la m-AMSA a una concentración final de 50  $\mu\text{M}$ . La reacción



---

---

se incubó a 37 °C durante 30 minutos y la reacción se detuvo adicionando 4 µL de solución amortiguadora de carga.

Todo el volumen de las muestras fue cargado en un gel de agarosa al 1% en solución amortiguadora de corrida TAE, con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. El gel con los productos separados fue fotografiado y analizado por densitometría usando el programa de cómputo ImageJ®. La presencia de ADN superenrollado y de bandas de ADN con peso molecular del ADN lineal indica la inhibición de la topoisomerasa II humana (Fortune y Osheroff, 1999).

### **Obtención de linfocitos de sangre periférica.**

Se obtuvo sangre periférica por venopunción de donadores adultos sanos en condiciones de ayuno, con el sistema vacutainer en tubos heparinizados. Se tomaron 5 mL de sangre y se mezclaron con 5 mL de PBS. En la obtención de linfocitos se empleó ficoll (Ficoll-Paque PLUS® Amershams Biosciences) y se siguieron las indicaciones de uso. Brevemente, a la mezcla anterior se adicionó lentamente por goteo en las paredes del tubo 6 mL de ficoll. Se centrifugó a 1200 rpm durante 35 minutos. Al final de la centrifugación se obtienen dos fases: la fase inferior de color rojo intenso contiene eritrocitos y plaquetas; la fase superior puede presentar un color rojo pálido por hemólisis corresponde al ficoll; la fase que se colectó es la intermedia entre estas dos, un anillo blanco que contiene linfocitos. La interfase se succionó con una pipeta Pasteur, se pasó a otro tubo de centrifuga, al cual se le adicionaron 5 mL de PBS, y se centrifugó a 1200 rpm, durante 10 minutos. Nuevamente, se realizaron dos lavados del mismo modo y el paquete celular se resuspendió con poco medio de cultivo RPMI complementado.

### **Determinación de la citotoxicidad de D3CLP en linfocitos de sangre periférica.**

La viabilidad celular se puede determinar empleando sales de tetrazolio, como el MTT. Estas sales amarillas, son reducidas por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produciendo un derivado de formazán de color azul intenso,



---

---

insoluble en medio acuoso. La reducción ocurre solamente en células vivas, lo que permite evaluar la viabilidad al compararlo con el control respectivo (Lawrence, et al., 2000; Kumi, et al., 1998; Carmichael, et al., 1985).

Las células se contaron en una cámara de Neubauer, se colocaron por triplicado  $5 \times 10^5$  células, en un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión de linfocitos por pozo, en placas para cultivo celular de 96 pozos, y a esta suspensión se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI, que contenían 10  $\mu\text{g/mL}$  de fitohemaglutinina (PHA), para promover la división celular. Estos cultivos se trataron con D3CLP a una concentración final de 2.5, 5, 10, 50 y 100  $\mu\text{M}$  y con el vehículo (DMSO). También, se consideraron células a las que se les adicionó únicamente fitohemaglutinina y otras sin ella. Las células se incubaron durante 48 horas en condiciones óptimas para el cultivo celular. Posteriormente se determinó colorimétricamente la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT.

Al término de la interacción con los diferentes tratamientos se les adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de solución de MTT 2.5  $\text{mg/mL}$  a cada pozo, para incubar nuevamente a 37 °C, durante 4 horas. Posteriormente, se les retiró el medio de cultivo conteniendo los respectivos tratamientos y se les adicionaron 100  $\mu\text{l}$  de DMSO para disolver los cristales precipitados de tetrazolio con ayuda de una micropipeta. Se determinó la absorbancia de cada tratamiento a 550 nm.

El porcentaje de células muertas se calculó en relación a las células sin tratamiento y de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 * [1 - (A_{+T} / A_{-T})]$$

donde;

% I: Porcentaje de inhibición de la proliferación

$A_{+T}$ : Absorbancia de las células con el correspondiente a un tratamiento

$A_{-T}$ : Absorbancia de las células sin tratamiento



---

---

Para obtener el valor de IC<sub>50</sub> se realizó un análisis de regresión no lineal de los porcentajes de inhibición en función de la concentración respectiva, para cada concentración, empleando el programa OriginPro® 7.0 para cada uno de los ensayos. El valor final de IC<sub>50</sub> es el resultado del promedio de tres experimentos independientes.

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de estudios de citometría de flujo, actividad de caspasas ejecutoras y citotoxicidad en linfocitos fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza de una sola vía (ANOVA), seguida por una prueba de comparación múltiple de Tukey. Los resultados de intercalación se analizaron con la prueba “t” de *student*. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism® 5.00.288. Las gráficas muestran los promedios y la desviación estándar de al menos tres experimentos.



---

---

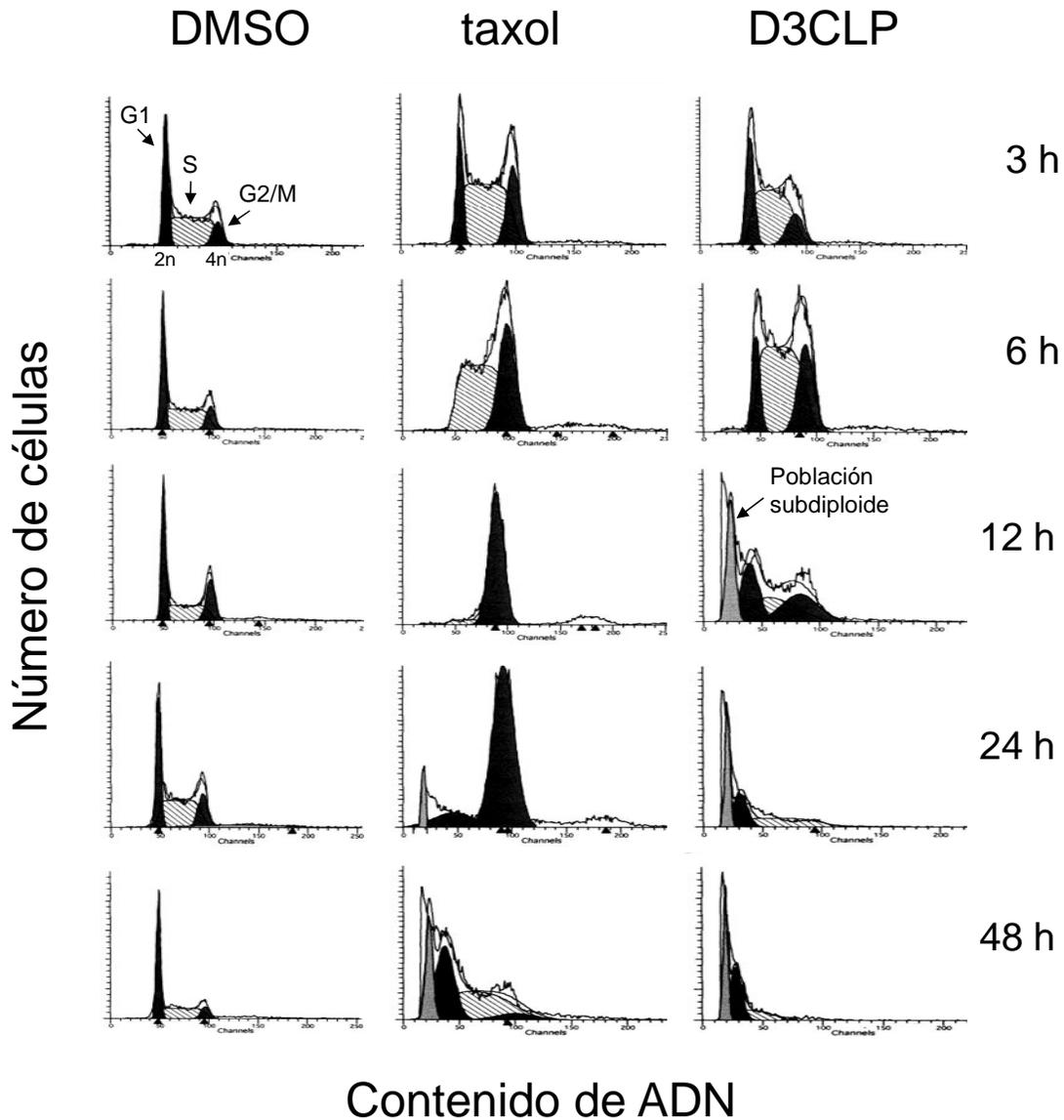
## 11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo.**

Con el fin de analizar posibles alteraciones en el ciclo celular se trataron células K-562 con D3CLP, taxol y DMSO. En la figura 8 se muestran histogramas representativos de tres experimentos. El DMSO empleando como disolvente de los compuestos no provocó variaciones en las poblaciones celulares a los tiempos analizados (figura 8), como se puede observar en los histogramas de distribución de frecuencias del contenido de ADN. Se puede observar poblaciones de células con contenido de ADN diploide (G0-G1 con contenido de ADN  $2n$ ), tetraploide (G2-M con contenido de ADN  $4n$ ), células en fase de síntesis de ADN (S, contenido de ADN mayor a  $2n$  y menor a  $4n$ ).

El tratamiento de células K-562 con D3CLP no produjo alteraciones significativas del ciclo celular a las 3 y 6 horas. A las 12 horas, se hizo evidente la presencia de una población subdiploide que corresponde a restos celulares con contenido de ADN menor a  $2n$ . Esta última población contiene células muertas (Hang y Fox, 2003). A las 24 horas las células de la población disminuyeron y, al presentar daño al ADN, fueron agrupadas en poblaciones con contenido de ADN menor a  $2n$  agrupadas en el pico subdiploide, como se aprecia por el aumento de la población en G0/G1. A las 48 horas se observó que la población G2/M era mínima, el número de células en fase S también disminuyó, y las poblaciones G0/G1 y subdiploide aumentaron. El aumento en estas poblaciones no se debe a procesos de división celular, sino a una fragmentación del ADN y un daño celular. Lo cual se pudo corroborar al microscopio, donde todas las células habían perdido su refringencia, indicando que ya se encontraban muertas (datos no mostrados).





**Figura 8.** Histogramas representativos de citometría de flujo de células K-562 con diferentes tratamientos. A la izquierda, se observan histogramas de citometría de células incubadas con el vehículo (DMSO), en la parte superior se indica la distribución de las células. La incubación de células K-562 con DMSO no produce alteraciones del ciclo celular. En el tratamiento con D3CLP, desde las 12 horas se produjo a una población subdiploide, presente hasta las 48 horas, sin un arresto previo del ciclo celular. El tratamiento con taxol induce un arresto del ciclo celular en G2/M. Desde las 6 horas del tratamiento con taxol, las células se empiezan a acumular en G2/M y las poblaciones en G0/G1 y S disminuyen. La mayoría de células se encuentran en arresto del ciclo celular a las 12 y 24 horas, para finalmente disminuir el contenido de ADN a las 48 horas del tratamiento.

---

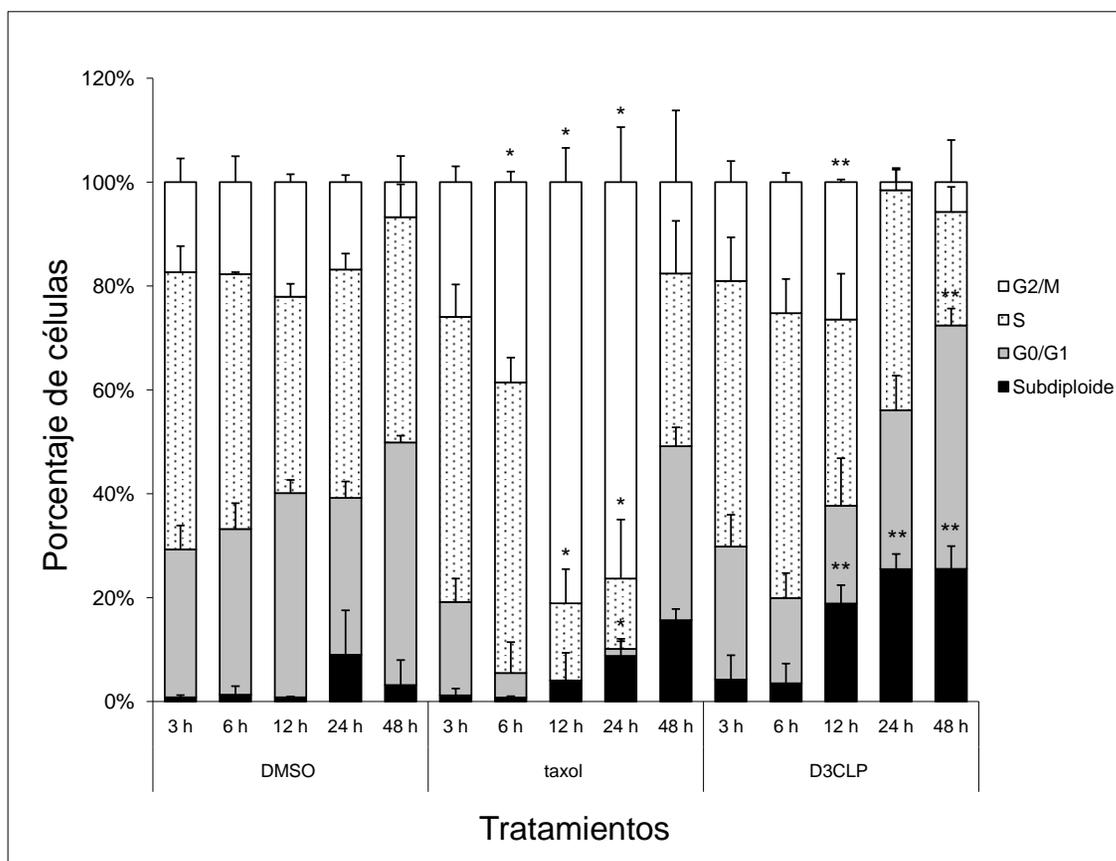
---

Como control se empleo el taxol, que es un conocido agente con actividad citotóxica, que causa una estabilización de microtúbulos induciendo arresto del ciclo celular y apoptosis (Gangemi, et al., 2000). El tratamiento de las células con taxol causó arresto del ciclo celular, que se hizo evidente por la acumulación las células en G2/M desde las 6 horas, disminuyendo la población G0/G1. A las 12 horas de tratamiento, casi todas las células se encontraron arrestadas en G2/M para posteriormente morir. Dicho arresto del ciclo celular se mantuvo hasta las 24 horas, a este mismo tiempo, se empezó a observar una población subdiploide. A las 48 horas, la población subdiploide se hace más evidente y aparece una población G0/G1 debido a la fragmentación y disminución del contenido de ADN celular inducido por el tratamiento con taxol.

En la figura 9, se muestra de modo gráfico el promedio de tres experimentos independientes de citometría de flujo con su respectiva desviación estándar. En esta figura, se puede apreciar cómo cambia cada población celular por el contenido de ADN. En el análisis estadístico de estos resultados, se encontró que el porcentaje de células (o restos celulares) agrupados en la población subdiploide a las 12, 24 y 48 horas en el tratamiento con D3CLP, es significativamente diferente comparado con el DMSO y taxol, a los mismos tiempos. La población G0/G1 en células tratadas con D3CLP presentó un aumento significativo a las 48 horas, comparado también, con el DMSO y taxol. El porcentaje de células que se acumularon en G2/M (células en arresto del ciclo celular), inducido por el tratamiento con taxol a las 6, 12 y 24 horas, son significativamente diferentes del DMSO y D3CLP, a los mismo tiempos.

Estos resultados muestran que el tratamiento de células K-562 con D3CLP no induce arresto del ciclo celular en alguna de sus fases, pero produce la aparición de una población subdiploide, desde tiempos tempranos del tratamiento. Esta población se ha asociado a células con ADN fragmentado o detrito celular (Hang y Fox, 2003).





**Figura 9.** Distribución de células en las fases del ciclo celular. El tratamiento de células K-562 con D3CLP produce una población subdiploide desde tiempos más tempranos comparada con taxol, con la consiguiente disminución de la población G2/M. Se graficaron los resultados para tres experimentos con su desviación estándar. \*\* $p < 0.05$  comparado con DMSO y taxol a la misma hora de tratamiento, \* $p < 0.05$  comparada con DMSO y D3CLP a la misma hora de tratamiento.

### Determinación de fragmentación de ADN mediante el ensayo de TUNEL.

Una característica común en varios tipos de muerte celular es la fragmentación de ADN. Dicha fragmentación puede presentarse en forma aleatoria como en el caso de la necrosis, o en tamaños bien definidos (fragmentos oligonucleosomales de aproximadamente 200 pares de bases), en el caso de la fragmentación de ADN inducida por la activación de caspasas. Además, se presentan diferentes tipos de compactación de la cromatina.

Para determinar la posible fragmentación de ADN en células K-562 tratadas con D3CLP, sugerida por la presencia de la población subdiploide en los histogramas



---

---

de citometría de flujo, se realizó un ensayo de TUNEL (figura 10). Este ensayo enzimático permite marcar ADN fragmentado. Además puede evidenciar algunas alteraciones morfológicas sugerentes de apoptosis tales como condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo y la presencia de cuerpos apoptóticos (Williams, et al., 1991; Gorezyca, et al., 1993).

Las células K-562 incubadas con DMSO no mostraron marcaje con el ensayo de TUNEL, aún a las 48 horas, indicando que no se produce fragmentación del ADN (figura 10G).

En células K-562 tratadas con D3CLP a una concentración de 7.8  $\mu$ M, el ADN fragmentado positivo a la reacción de TUNEL y la cromatina condensada, se presentaron desde las 12 horas (figura 10C). A las 24 horas, aun se observó condensación de la cromatina en las células y el marcaje positivos al ensayo de TUNEL (figura 10F), en concordancia con los resultados del análisis del contenido de ADN por citometría de flujo, donde aparece una población subdiploide (figura 8 y 9). La exploración de diversos campos presentó una disminución considerable del número de células, mientras que a las 48 horas se encontró una gran cantidad de restos celulares positivos al ensayo de TUNEL, con algunas de las características sugerentes de muerte por apoptosis, como la condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo o cariorexis (figura 10I). El número de células fue variable a los diferentes tiempos, debido probablemente a una fijación pobre de las células después de los tiempos de tratamiento respectivos.

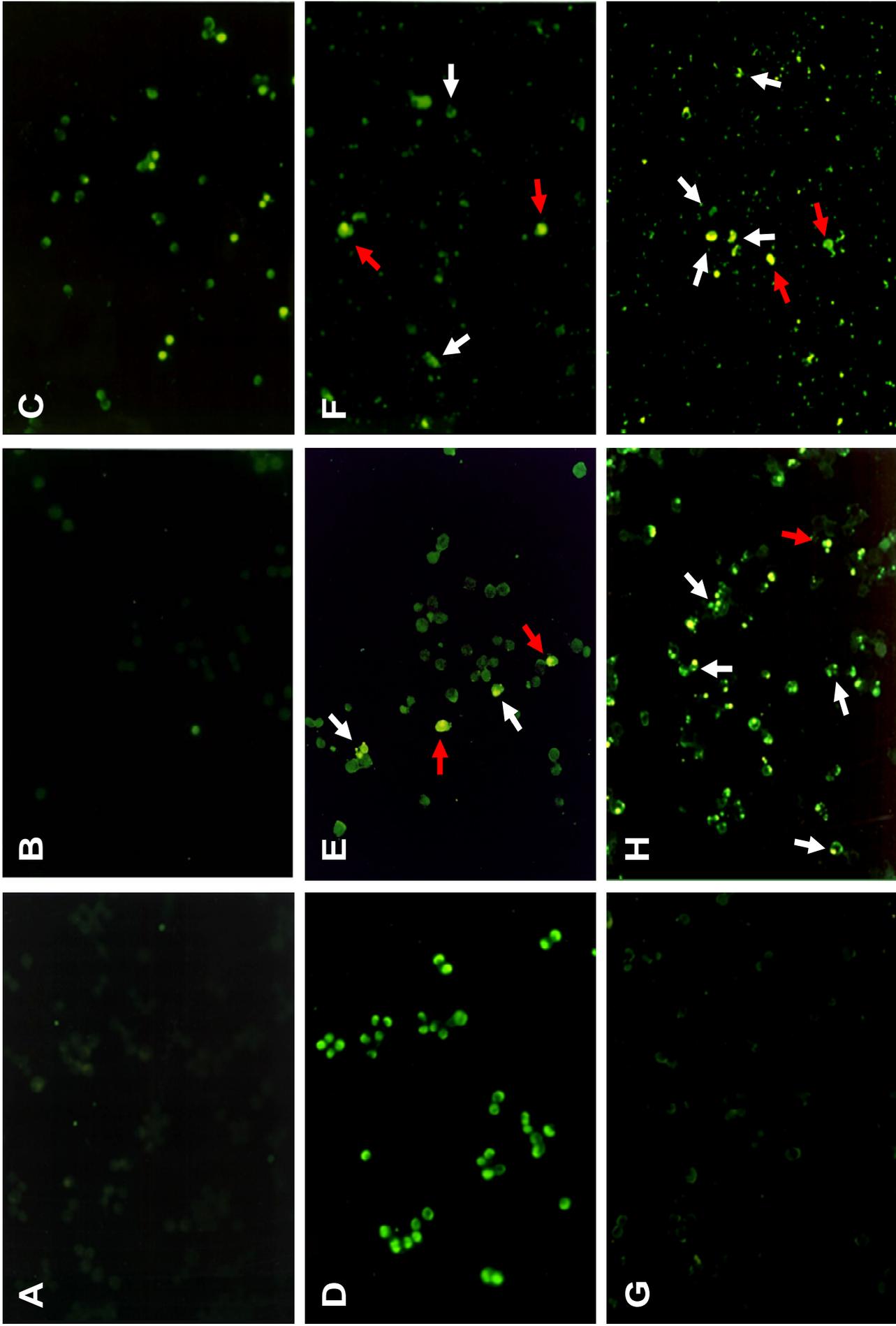
Como un control de apoptosis se empleo el taxol (Gangemi, et al., 2000). Se observó que efectivamente el taxol produjo fragmentación de ADN, ya que, desde las 24 horas se observan los núcleos de las células K-562 marcados con fluorescencia (figura 10E). A las 48 horas, fueron evidentes algunas de las características de la muerte apoptótica inducida por el taxol en estas células, como la condensación de la cromatina, cariorexis y la presencia de cuerpos apoptóticos, constituidos por membrana plasmática que engloba material nuclear y

---

---

citoplásmico (figura 10H). Se ha reportado que éstas características aparecen después de que se han activado las caspasas ejecutoras, particularmente la caspasa-3 (Gangemi, et al., 2000).

En el tratamiento de células K-562 con D3CLP, se presentan algunas características de apoptosis, como la fragmentación de ADN, condensación de cromatina y fragmentación del núcleo. Esto sugiere que el proceso de muerte celular en células K-562 tratadas con D3CLP sea por apoptosis.



**Figura 10.** Determinación de la fragmentación de ADN en células K-562 tratadas con D3CLP, mediante TUNEL, mediante DMSO por 12, a las que no se les realizó el ensayo de TUNEL, fondo de fluorescencia. D) Células incubadas con DMSO por 48 horas, control negativo. E), F) y H) Células tratadas con DMSO por 12, 24 y 48 horas, respectivamente, control positivo de apoptosis. G), F) e I) Células tratadas con D3CLP a 12, 24 y 48 horas, respectivamente. El tratamiento con D3CLP produjo características sugerentes de apoptosis. Las flechas rojas indican células con cromatina condensada y las flechas blancas indican células con núcleo fragmentado. Todas las fotografías se encuentran a un aumento de 20X.

---

---

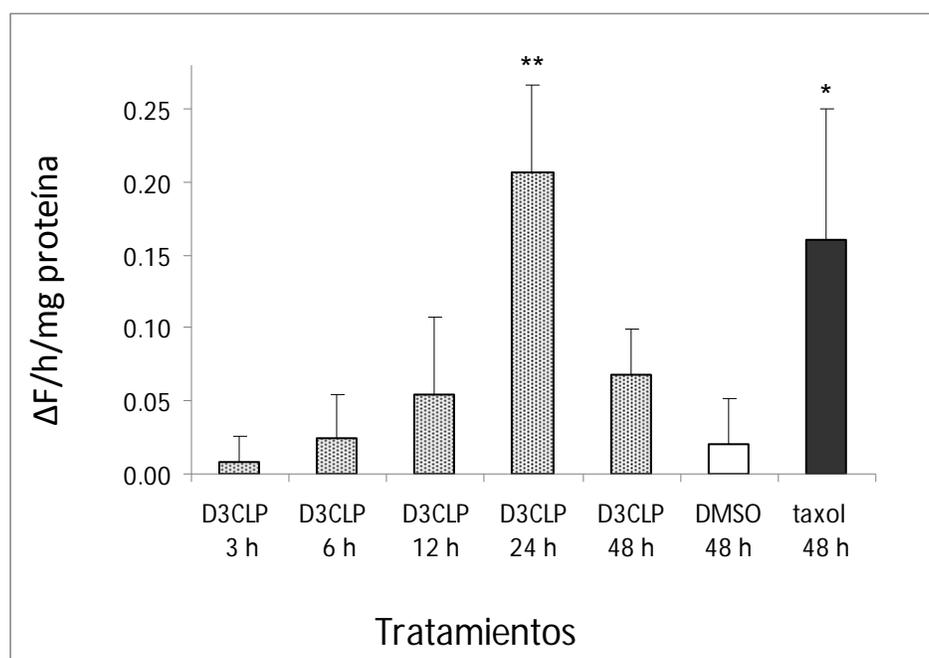
## **Análisis de la actividad de caspasa-3 en células K-562 con diferentes tratamientos.**

En la muerte celular programada de tipo apoptótico se activan las caspasas, que son proteasas de cisteína-aspartato. La activación de caspasas por la vía extrínseca (caspasa-8 y 10), convergen con las activadas por la vía intrínseca o mitocondrial (caspasa-9) en la activación de caspasas ejecutoras (caspasa-3, 6 y 7). La actividad de las caspasas ejecutoras es responsable de las características morfológicas de la apoptosis. La caspasa-3 es capaz de cortar sustratos como el inhibidor de la DNasa activada por caspasas (ICAD, conduciendo a la fragmentación de ADN característica en la apoptosis), PARP (enzima encargada de la reparación del ADN), actina, fordrina, entre otros. La caspasa-3 activa conduce a la formación de protuberancias en la membrana celular (blebbing) vía la activación del fragmento cinasa de ROCK1, fosforilando permanentemente a la cadena ligera de la miosina (Lawen A., 2003).

La actividad de las caspasas ejecutoras puede estudiarse *in vitro*, empleando péptidos sintéticos como Ac-DEVD-AMC (Moran, et al., 1999; Caballero-Benítez y Morán, 2003). La actividad de caspasas ejecutoras en cada muestra se puede expresar como el cambio en la intensidad de la fluorescencia por hora por miligramo de proteína.

Al evaluar la actividad de caspasas ejecutoras en extractos de proteínas totales de células tratadas con D3CLP, se encontró que dicha actividad se incrementa con la duración del tratamiento, presentando un máximo de actividad a las 24 horas (figura 11). A las a las 48 horas disminuye su actividad, ya que a este tiempo la mayor cantidad de células ha muerto, como se pudo corroborar por microscopía óptica (datos no presentados). El aumento en la actividad de caspasas ejecutoras, es congruente con el aumento de la fragmentación de ADN en células K-562 mostrada por citometría de flujo (figura 10), sugiriendo que la fragmentación de ADN es mediado por la activación de las caspasas ejecutoras. La caspasa-3 activa puede escindir al inhibidor ICAD, liberando a la endonucleasa CAD que

corta al ADN, lo que puede producir poblaciones subdiploides con ADN fragmentado (Nagata S., 2000), como las presentadas en el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo (figuras 8 y 9). La disminución de la actividad de caspasas ejecutoras a 48 horas, se debe probablemente a la activación de otras proteasas capaces de fragmentar moléculas como las caspasas ejecutoras inactivándolas.



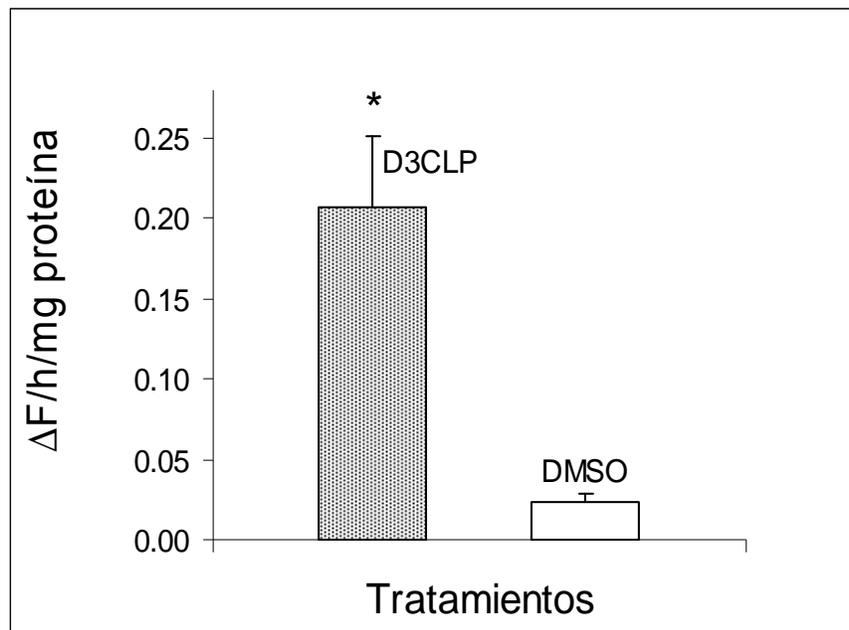
**Figura 11.** Actividad de caspasas ejecutoras en células K-562 tratadas con D3CLP a diferentes tiempos. La actividad de caspasas ejecutoras en cada muestra se expresó como el cambio en la intensidad de la fluorescencia por hora por miligramo de proteína ( $\Delta F/h/mg$  proteína). El tratamiento de células K-562 con D3CLP produce un aumento de la actividad de caspasas ejecutoras con la duración del tratamiento. Se usó como control de caspasas ejecutoras activadas a un lisado de células K-562 tratadas con taxol por 48 horas. Se graficaron los resultados para tres experimentos con su desviación estándar. \*\* $p < 0.05$  comparado con los tratamientos con D3CLP a diferentes tiempos, \* $p < 0.05$  comparado con DMSO a 48h de tratamiento. Los experimentos fueron realizados por cuadruplicado.

---

---

Se tomó como control de caspasas ejecutoras activas a extractos de proteínas de células K-562 tratadas con taxol a 48 horas de incubación, en los que se produce apoptosis y las caspasas ejecutoras están activadas (Gangemi, et al., 2000). La incubación de células K-562 con DMSO produjo una actividad basal de caspasas ejecutoras.

Al analizar la actividad de caspasas ejecutoras en células K-562 tratadas con D3CLP por 24 horas, comparadas con DMSO al mismo tiempo, se observaron diferencias significativas, como se puede apreciar en la figura 12.



**Figura 12.** Actividad de caspasas en células K-562 tratadas con D3CLP comparada con DMSO a 24 horas de incubación. La actividad de caspasas ejecutoras en células tratadas con D3CLP muestra diferencias significativas respecto al control de disolvente (\* $p < 0.01$ ). Las barras muestran el promedio de tres experimentos con su desviación estándar. Se graficaron los resultados para tres experimentos con su desviación estándar.

Es importante estudiar el tipo de muerte celular inducido por compuesto con potencial actividad contra el cáncer, ya que se prefiere aquellos que al inducir muerte en las células neoplásicas, lo hagan por mecanismos de muerte celular

---

---

programada (MCP), y no aquellos que induzcan muerte por oncosis o necrosis, provocando una respuesta inflamatoria en el tejido circundante al tumor. Los resultados de actividad de caspasas ejecutoras, muestran que en el tratamiento de células K-562 con D3CLP, se activan dichas caspasas. Las caspasas ejecutoras activas son las responsables de la morfología apoptótica, por lo que, se puede decir que D3CLP induce apoptosis en células K-562. Esto convierte al derivado tiazolo[5,4-b]quinolina D3CLP, en un compuesto candidato a usar en la terapia contra el cáncer.

### **Intercalación de D3CLP en el ADN.**

Muchos compuestos aromáticos con estructuras planas pueden interactuar con el ADN, como por ejemplo, las antraciclinas, mitoxantrona o dactinomicina, que pueden intercalarse perpendicularmente al eje de la hélice del ADN entre pares de bases, alterando mínimamente el patrón global de puentes de hidrógeno que unen las dos hebras. Este proceso se encuentra favorecido ya que la mayoría de estos compuestos son lipofílicos o poco hidrosolubles y la región entre pares de bases es hidrofóbica (Avendaño y Menéndez, 2008).

Dado que estructuras relacionadas a las 9-anilinoacridinas han mostrado ser agentes que se intercalan en el ADN, evaluamos si D3CLP podía intercalarse al ADN mediante un ensayo de desplazamiento de bromuro de etidio a partir del ADN *in vitro* (Rodríguez-Loaiza, et al., 2004). Los valores de  $Q_{max}$  (tabla 4), indican que D3CLP puede intercalarse en el ADN y producir un mayor apagamiento de la fluorescencia debida al bromuro de etidio que el derivado tiazolo[5,4-b]quinolina R10, previamente reportado (Rodríguez-Loaiza P, et al 2004). El compuesto D3CLP mostró que se puede intercalar más eficientemente en el ADN que R10, ya que se necesita una concentración menor para disminuir al 50% la fluorescencia del bromuro de etidio comparado con R10, como lo indican los valores de  $Q_{05}$  (tabla 4). Los resultados indican que el compuesto D3CLP se puede intercalar en el ADN, como lo muestran las constantes aparentes de

---

---

desplazamiento de bromuro de etidio, sin embargo, no hubo diferencias significativas en los valores de las constantes para los compuestos analizados.

Como se muestra, el compuesto D3CLP se intercala en el ADN y esto puede ser responsable, al menos en parte, de la citotoxicidad de este compuesto en células K-562. Los compuestos que se intercalan en el ADN pueden interferir con procesos de vital importancia para las células. Los compuestos que se intercalan en el ADN producen cambios estructurales que interfieren con el reconocimiento y función de proteínas que interactúan con el ADN, entre ellos factores de transcripción, polimerasas, enzimas de reparación de ADN y las topoisomerasas (Avendaño y Menéndez, 2008).

**Tabla 4.** Constantes aparentes de desplazamiento de bromuro de etidio del ADN para derivados tiazolo[5,4-b]quinolina. Los valores corresponden al promedio de tres experimentos, con su desviación estándar.

Compuesto	Q <sub>max</sub>	Q <sub>05</sub>
D3CLP	21.17% ± 5.38	16.523 ± 7.87
R10*	18.86% ± 0.74	22.989 ± 4.55

Q<sub>max</sub> es el máximo apagamiento de la fluorescencia debido a los compuestos.

Q<sub>05</sub> es la concentración (mM) que produce un 50% del apagamiento de la fluorescencia.\*Modificado de Rodríguez-Loaiza P, et al 2004

### **Evaluación de la relajación de ADN superenrollado.**

Las topoisomerasas son enzimas que participan en el enrollamiento y relajación del ADN, induciendo cortes transitorios en él. Los compuestos que inhiben a las topoisomerasas convierten a estas enzimas necesarias en un arma letal para la célula, induciendo cortes permanentes al ADN. La generación de cortes permanentes al ADN *in vivo*, por la inhibición de la topoisomerasa II puede conducir a eventos letales para la célula, como: recombinación, fragmentación de cromosomas, y traslocaciones entre otros (Fortune y Osheroff, 2000). Cuando en

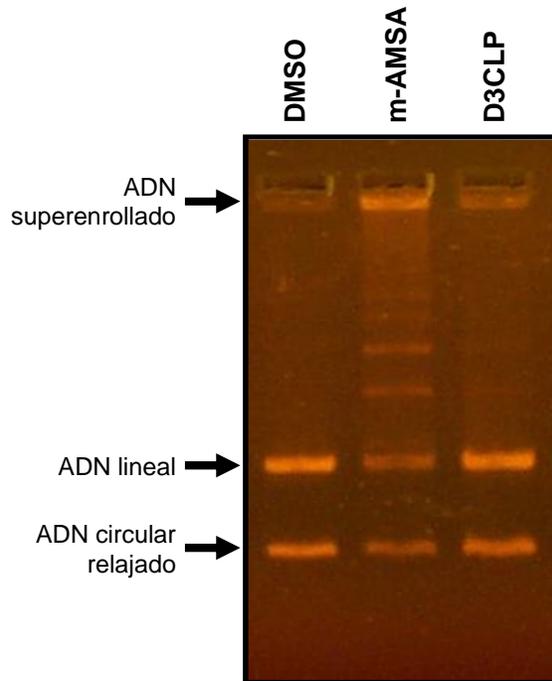
---

---

una célula hay una gran cantidad de cortes al ADN que ya no pueden ser reparados se activan mecanismo de muerte celular programada en la que participan el gen *p53* y sus homólogos *p63* y *p73* (Fortune y Osheroff, 2000; Holland y Frei, 2000).

La citotoxicidad de algunos derivados de la 9-anilino acridina, como el compuesto antileucémico amsacrina (figura 2), se debe principalmente a la formación de complejos muy estables con el ADN y con la topoisomerasa II (Nelson, 1984). Tomando en cuenta esta estructura se han diseñado nuevas moléculas buscando compuestos con potencial actividad contra el cáncer, como los derivados tiazolo[5,4-b]quinolina (Alvarez-Ibarra, et al., 1997; Rodríguez-Loaiza, et al., 2004; Loza-Mejía, et al., 2008).

La inhibición de la topoisomerasa II, se puede evaluar *in vitro*, mediante la relajación de ADN superenrollado. Al analizar la actividad de la topoisomerasa II en presencia DMSO (control de disolvente), se observó que no inhibe la actividad de la topoisomerasa II, relajando el ADN superenrollado a dos bandas correspondientes a ADN lineal y ADN circular relajado (figura 13). El compuesto D3CLP inhibe dicha enzima, como se puede observar por la presencia de ADN superenrollado en el pozo donde se cargó la muestra y por la presencia de bandas de ADN de peso molecular mayor al ADN lineal. El compuesto D3CLP puede inhibir a la topoisomerasa II, aunque no lo hace tan eficientemente como el control de amsacrina. Esta inhibición *in vitro*, sugiere que *in vivo*, D3CLP puede inducir cortes al ADN, después de interactuar con otras enzimas que lo procesan, y activar señales en respuesta al daño al ADN.



**Figura 13.** Inhibición de la topoisomerasa II por D3CLP *in vitro*. El DMSO no inhibe a la topoisomerasa II, ya que permite la relajación del ADN superenrollado a ADN lineal y ADN circular relajado (carril 1). En el carril 2, se muestra el control de inhibición de la topoisomerasa II, amsacrina (m-AMSA). El derivado D3CLP inhibe la topoisomerasa II, se observa ADN superenrollado en el pozo donde se colocó la muestra y bandas por arriba del DNA lineal (carril 3). Todos los compuestos se encontraban a 50  $\mu$ M. Imagen representativa de tres experimentos.

Una de las características genéticas de las células K-562, es que el gen *p53* está mutado (Lobbert et al., 1988; Law, et al., 1993). Mutaciones en el gen *p53* generan células resistentes a la muerte cuando hay daño al ADN. Por ejemplo, al tratar con m-AMSA células de adenocarcinoma de colon HCT116, con el gen *p53* silvestre (+/+) y mutado (-/-), las células con *p53* silvestre fueron más sensibles al tratamiento que las células con *p53* mutado (Wang, et al., 2005).

Lo anterior no correlaciona con los resultados previos de citotoxicidad de D3CLP (tabla 3). Se esperaría que las células K-562 al tener el *p53* mutado fueran más resistentes que células como HeLa, MCF-7, SW-480, SW-620 o Calo y dichos

---

---

resultados de citotoxicidad, mostraron que las células K-562 son tan sensibles como las demás líneas celulares analizadas (Camacho, et al., 2005).

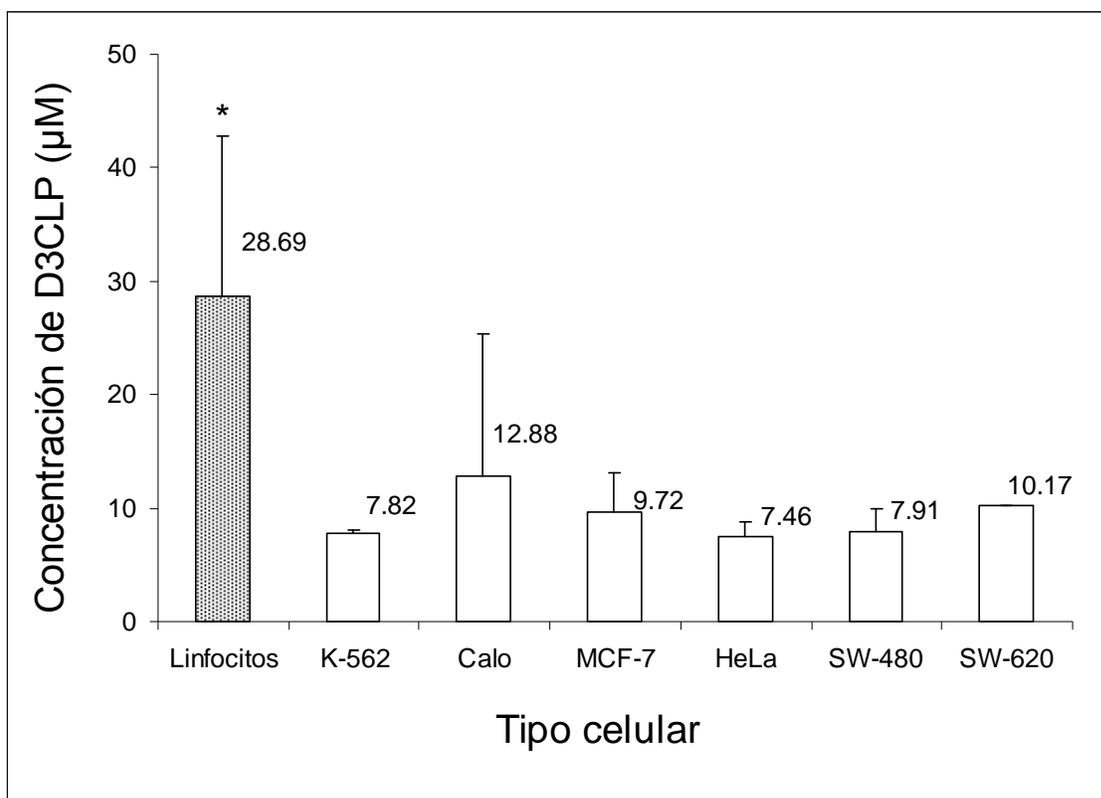
Los resultados de intercalación al ADN y de evaluación de la relajación de ADN superenrollado, nos sugiere que, en la citotoxicidad inducida por D3CLP en células K-562, además de sus propiedades de intercalación en el ADN y de inhibición de topoisomerasa II, D3CLP debe producir daño a las células por otro mecanismo para inducir la muerte celular.

### **Determinación de la citotoxicidad de D3CLP en linfocitos de sangre periférica.**

Al evaluar un nuevo compuesto con actividad potencial antitumoral, se debe determinar si dicho compuesto presenta selectividad por las células neoplásicas, y en caso contrario es importante conocer la citotoxicidad en células no tumorales.

Con el objetivo de conocer si el nuevo compuesto de tiazolo [5,4-b]quinolina presenta actividad citotóxica en células no tumorales, se trataron linfocitos de sangre periférica con D3CLP a diferentes concentraciones para determinar la  $IC_{50}$ . En la figura 14 se muestra de modo gráfico la  $IC_{50}$  de D3CLP en linfocitos de sangre periférica, así como también en diferentes células tumorales. Como se puede observar, se necesita aproximadamente cuatro veces la  $IC_{50}$  determinada en K-562, para producir el mismo efecto en linfocitos de sangre periférica. La  $IC_{50}$  para linfocitos, muestra diferencias estadísticamente significativas con datos previos de citotoxicidad en células K-562, HeLa y SW-480 (Camacho, et al., 2005). Lo cual nos indica que si bien D3CLP puede inducir la muerte a los linfocitos, elimina de manera más eficiente a las células tumorales. La variabilidad en la  $IC_{50}$  para linfocitos se debe a que en cada determinación se usó sangre de un donador diferente.

Finalmente, el que D3CLP haya presentado una mayor citotoxicidad en células tumorales, nos sugiere que este compuesto en una siguiente etapa puede ser evaluado en modelos animales y quizás en un futuro llegar a ser de uso clínico en pacientes.



**Figura 14.** Citotoxicidad de D3CLP en células no tumorales. El compuesto D3CLP es más citotóxico en líneas tumorales que en linfocitos de sangre periférica. Se necesita cuatro veces la concentración citotóxica en células K-562 para producir el mismo efecto en células no tumorales, dicha diferencia fue significativa. La  $IC_{50}$  para linfocitos muestra diferencias significativas comparado con células K-562, HeLa y SW-480 (\* $p < 0.05$ ). Los experimentos se realizaron por triplicado.

---

---

## 12. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que el compuesto D3CLP elimina a las células K-562 induciendo fragmentación de ADN y la activación de caspasas ejecutoras, en un proceso apoptótico. Es importante estudiar el tipo de muerte celular inducido por compuesto con potencial actividad contra el cáncer, ya que se prefiere aquellos que al inducir muerte en las células neoplásicas lo hagan por mecanismos de muerte celular programada (MCP), a diferencia de los que inducen muerte celular por necrosis induciendo una respuesta inflamatoria en el tejido circundante al tumor.

El compuesto D3CLP ha mostrado que se puede intercalar en el ADN, así como también inhibir a la topoisomerasa II humana, pero estos resultados no explican completamente la citotoxicidad del derivado tiazolo [5,4-b]quinolina D3CLP, sugiriendo que en la citotoxicidad mediada por D3CLP en células de leucemia K-562 además de sus propiedades de intercalación en el ADN e inhibir la topoisomerasa II, D3CLP debe producir daño a las células por otro mecanismo para inducir la muerte celular. Conocer el mecanismo por el cual un fármaco ejerce su efecto biológico es vital, ya que dos fármacos en combinación que actúen sobre el mismo blanco molecular o a diferentes niveles en una vía de señalización pueden presentar efectos antagónicos, lo que no representa ningún beneficio para el paciente.

La actividad citotóxica de D3CLP es mayor en células tumorales que en células no tumorales. Esta característica y el tipo de muerte inducido por D3CLP lo hace un compuesto de interés, para el posible uso en el tratamiento del cáncer.



---

---

### 13. PERSPECTIVAS

Evaluar la inhibición de la topoisomerasa II del compuesto D3CLP *in vivo*, para determinar si este mecanismo participa en la citotoxicidad a nivel celular.

Es importante saber si D3CLP provoca daño celular por otro mecanismo, como vía la formación de radicales libres (estrés oxidativo).

El compuesto D3CLP es más citotóxico para células tumorales que para linfocitos, por lo que sería interesante evaluarlo en modelos de regresión tumoral.

Evaluar su uso en combinación con otros antineoplásicos de uso clínico, tanto en cultivo, como en modelos de regresión tumoral.



---

---

## 14. REFERENCIAS

- Alberts B., (Editor, 2002). *Biología molecular de la célula*. 3ª edición. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 924-976.
- Alison, M. R., (Editor, 2002). *The cancer handbook*. NPG. London. pp. 12-35,1271-1346.
- Alvarez-Ibarra, C., Fernández-Granda, R., Quiroga, M. L., Carbonell, A., Cárdenas, F., Giralt, E., (1997). Synthesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *J. Med. Chem.* 40:668-676.
- Avendaño C., Menéndez J. C., (2008). *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. 1st edition. Elsevier, Oxford UK. pp. 1-53, 103-111, 199-228.
- Bamford M., Walkinshaw G., Brown R., (2000). Therapeutic applications of apoptosis research. *Experimental Cell Research* 256:1-11.
- Baquiran, D. C., Gallagher, J., (Editors, 2001). *Lippincott's cancer chemotherapy handbook*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Bargou, R. C., Daniel, P. T., Mapara, M. Y., Bommert, K., Wagener, C., Kallinich, B., Royer, H. D., Dörken, B., (1995). Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: Low bax-a expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int. J. Cancer.* 60:854-859.
- Bonjean. K., De Pauw-Gillet. M.C., Defresne. M.P., Colson. P., Houssier. L., Dassonneville. L., Baily. C., Greimers. R., Wright. C., Quentin-Leclercq. J., Tits. M., Angenot. L., (1998). The DNA intercalating alkaloid cryptolepine interferes with topoisomerase II and inhibits primarily DNA synthesis in B16 melanoma cells. *Biochemistry* 37: 5136-5146.
- Bröker L. E., Kruyt F. A. E., Giaccone G., (2005). Cell death independent of caspases: A review. *Clin. Cancer Res.* 11:3155- 3162.
- Caballero-Benítez A., Morán J., (2003). Caspase activation pathways induced by staurosporine and low potassium: role of caspase-2. *J. Neurosci. Res.* 71:383-96.



- 
- 
- Camacho A., Molina S., Lira A., Quintero A., (2005). Evaluación de la actividad citotóxica de nuevos derivados de tiazolo[5,4-b]quinolinas en líneas celulares humanas. Trabajo presentado en el Congreso Nacional de la Sociedad Química de México.
  - Carmichael J., Mitchell J. B., De Graff W. G., Gamson J, Gazdar A. F., Johnson B. E., Glaststein E., Minna J. D., (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer* 57:540-547.
  - Chen A. Y., Yu C., Gatto B., Liu L. F., (1993) DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8131-8135.
  - Cheng G. L., Yang L., Rowe T. C., Halligan B. D, Tewey K. M., Liu L. F., (1984). Nonintercalative antitumor drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 259:13560-13566.
  - Codogno P., Meijer A. J., (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Diff.* 12:1509-1518.
  - Devita V. T., Hellman S., Rosenberg S. A., (Editors, 2001). *Cancer: Principles and practice of oncology.* 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, USA.
  - Elinos-Báez C. M., Maldonado V., Meléndez-Zajgla J., (2003) Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac. Méd. Méx.* 139:493-499.
  - Ellis M. J. y Swain S. M., (1996). Steroid hormone therapies for cancer. En Chabner B. A., Longo D. L., (Editors). *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice.* 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, USA.
  - Estapé J. y González M., (1995). Historia natural y factores etiológicos del cáncer. En Farreras V. P., Rozman C. *Medicina interna.* 13ª edición. Mosby/Doyma. pp. 1133-1141.
  - Evans J. P., Wickremasinghe R. G., Hoffbrand A. V., (1987). Tyrosine protein kinase substrates in Philadelphia-positive human chronic granulocytic leukemia



- 
- 
- derived cell lines (K-562 and BV173): detection by using an immunoblotting technique. *Leukemia*. 1:524-5.
- Fink S. L., Cookson B. T., (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73:1907-1916.
  - Fortune J. M. y Osheroff N., (1999). Topoisomerase II-Catalyzed Relaxation and Catenation of Plasmid DNA. En Bjornsti M. A., Osheroff N., (Editors). *Methods in molecular biology*, volume 296. DNA Topoisomerase protocols, DNA topology and enzymes. Mechanisms and protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 275-282.
  - Fortune J. M., Osheroff N., (2000). Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: When enzymes stop being nice. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 64:221-253.
  - Gangemi, R. M. R., Santamaria B., Bargellesi A., Cosulich E. Fabbi M., (2000). Late apoptotic effects of taxanes on K-562 erythroleukemia cells: Apoptosis is delayed upstream of caspase-3 activation. *Int. J. Cancer*: 85:527-533.
  - Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A., (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493-501.
  - Gorezyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z., (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidil transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 53:1945-1951.
  - Hanahan D, Weinberg R. A., (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
  - Hang H., Fox M. H., (2003). Analysis of the mammalian cell cycle by flow cytometry. En Lieberman H. B (Editor). *Methods in molecular biology*, volume 241. Cell cycle checkpoint control protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 23-36.
  - Harper J. V., Brooks G., (2005). The mammalian cell cycle: An overview. En Humphrey T., Brooks G. (Editors). *Methods in molecular biology*, volume 296. Cell cycle control. Mechanisms and protocols. Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 120-160.



- 
- 
- Hernández M. M., Ríos H. M. A., (1999). Oncogenes y cáncer. Rev. Cubana. Oncol. 15:131-9.
  - Holland J. F., Frei E., (Editors, 2000). Cancer Medicine, 5th edition. B.C. Decker Inc. Ontario Canada. pp. 56-87, 115, 465-478, 625-647, 648-669, 670-679.
  - INEGI (2008). Boletín: "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer."  
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2008/cancer08.doc>. Revisado el 7 de mayo de 2008.
  - Kaufmann S. H., Earnshaw W. C., (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. Exp. Cell Res. 256:42-49.
  - Kerr J. F., Wyllie A. H., Currie A. R., (1972). Apoptosis: a basic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26:239.
  - Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V., (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 73:8, 2013-2023.
  - Kim P. K. M., Mahidhara R., Seol D. W., (2001). The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. Drug Resist. Updat. 4:293-296.
  - Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H., Toge T., (2002). Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. Cancer Chemother. Pharmacol. 50:343-352.
  - Kroemer G., El-Deiry W. S., Golstein P., Peter M. E., Vaux D., Vandenabeele P., Zhivotovsky B., Blagosklonny M. V., Malorni W., Knight R. A., Piacentini M., Nagata S., Melino G., (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. Cell Death Differ. 12:1463-1467.
  - Kumi J., Rodriguez R., Goudaze G., (1998). Influence of genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) on the growth and proliferation of testicular cell lines. Biol. Cell. 90:349-354.
  - Law J. C., Ritke M. K., Yalowich J., Leder G. H. Y., Ferrell R. E., (1993) Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K-562 cell line. Leuk. Res. 17:1045-1050.
  - Lawen A., (2003). Apoptosis: An introduction. Bioessays 25:888-896.



- 
- 
- Lawrence N., Rennison D., McGown A., Ducki S., Gul L., Hadfield J., Khan N., (2000). Linked parallel synthesis and MTT bioassay screening of substituted chalcones. *J. Com. Chem.* 3:421-426.
  - Lieberman, D. A., Hoffman, B., Steinman, R. A., (1995). Molecular controls of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene.* 11:199-210.
  - Lobbert, M. Miller, C. W. Crawford, L. Koeffler H. P., (1988) p53 in chronic myelogenous leukemia. *J. Exp. Med.* 167:873-886.
  - Loza-Mejía M A., Maldonado-Hernández K., Rodríguez-Hernández F., Rodríguez-Sotres R., González-Sánchez I., Quintero A., Solano J. D., Lira-Rocha A., (2008) Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* 16:1142-1149.
  - Lozzio B. B., Lozzio C. B., (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* 3:363-70.
  - Makin G., Hickman J. A., (2000). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res.* 301:143-153.
  - McCloskey D. E., Kaufmann S. H., Prestigiacomo L. J., Davidson, N. E., (1996). Paclitaxel induces programmed cell death in MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 2:847-854.
  - Merchant A. K., Loney L. T., Maybaum J., (1996). Expression of wild-type p53 stimulates an increase in both Bax and Bcl-xL protein content in HT29 cells. *Oncogene.* 13:2631-2637.
  - Moran J., Itoh T., Reddy U., Chen M., Alnemri E., Pleasure D., (1999) Caspase-3 expression by cerebellar granule neurons is regulated by calcium and cyclic AMP. *J. Neurochem.* 73:568-577.
  - Nagata S., (2000). Minireview: Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256:12-18.
  - Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittender T., Lutz R. J., Matsuda H., Tsujimoto Y., (1998). Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:14681-14686.



- 
- 
- National Cancer Institute, 2008. National Institutes of Health. U.S. <http://www.cancer.gov/>. Revisado el 10 de junio de 2008.
  - Nelson E. M., Tewey K. M., Liu L. F., (1984). Mechanism of antitumor drug action: poisoning of mammalian DNA topoisomerase II on DNA by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:1361-1365.
  - Oestergaard V. H., Knudsen B. R., Andersen A. H., (2004). Dissecting the cell-killing mechanism of the topoisomerase I targeting drug ICRF-193. *J. Biol. Chem* 27, 28100-28106.
  - OMS., (2006). Comunicado de prensa de la Organización Mundial de la Salud: "Día Mundial Contra el Cáncer: acción mundial para evitar 8 millones de muertes por cáncer de aquí a 2015". <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr06/es/index.html>. Revisado el 6 de diciembre de 2007.
  - Pitot H. C. y Loeb D. D., (2002). *Fundamentals of oncology*. 4th edition. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 41-60.
  - Pommier Y. G., Goldwasser F., Strumberg D., (1996). Topoisomerase II inhibitors: epipodophyllotoxins, acridines, ellipticines, and bisdioxopiperazines. En Chabner B. A., Longo D. L., (Editors). *Cancer chemotherapy and biotherapy: Principles and practice*. 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Philadelphia, USA.
  - Reed J. C., (2000). *Methods in enzymology*, volume 322. Apoptosis. Academic Press. San Diego, CA. pp. 33-38.
  - Rodríguez-Loaiza P., Quintero A., Rodríguez-Sotres R., Solano J. D., Lira-Rocha A., (2004). Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. *Eur. J. Med. Chem.* 39:5-10.
  - Sierra A., Castellsagué X., Coll T., Mañas S., Escobedo A., Moreno A., Fabra A., (1998). Expression of Death-Related Genes and their Relationship to Loss of Apoptosis in T1 Ductal Breast Carcinomas. *Int. J. Cancer.* 79:103-110.
  - Skeel R. T., (Editor, 2007). *Handbook of cancer chemotherapy*, 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. pp. 54-168.



- 
- 
- Sumantran V. N., Ealovega M. W., Nuñez G., Clarke M. F., Wicha M. S., (1995). Overexpression of Bcl-x<sub>S</sub> sensitizes MCF-7 cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 55:2507-2510.
  - Tang G. D., Li L., Chopra D. P., Porter A. T., (1998). Extended survivability of prostate cancer cells in the absence of trophic factors: increase proliferation, evasion of apoptosis, and role of apoptosis proteins. *Cancer Res.* 58:3466-3479.
  - Von Bernhardt M. R., (2004). Mecanismos de muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas: ¿apoptosis o necrosis?. *Rev. Chil. Neuro-Psiquiatr.* 42:281-292.
  - Wang J., Hsieh Y. J., Chu C. Y., Lin Y. L., Tseng T., (2002). Inhibition of cell cycle progression in human leukemia HL-60 cells by esculetin. *Cancer Lett.* 183:163-168.
  - Wang W., Ho W. C., Dicker D. T., MacKinnon C., Winkler J. D., Marmorstein R., El-Deiry W. S., (2005). Acridine derivatives activate p53 and induce tumor cell death through Bax. *Cancer Biol. Ther.* 4:893-898.
  - Williams G., (1991). Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 65:1097-1098.
  - Xia Y., Yang Z. Y., Xia P., Bastow K. F., Tachibana Y., Kuo S. C., Hamel Hackl T., Lee K. H. J., (1998). Antitumor agentes. 181. Síntesis and biological evaluation 6,7,2',3'4'- substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolin as new class of mitotic antitumor agents. *J. Med. Chem.* 41:1155-1162.
  - Yang E., Korsmeyer J. S., (1996). Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood.* 88:386-401.
  - Ye K., Ke. Y, Keshave N., Shanks J., Kapp J. A., Tekmal R. R., Petros J., Joshi H. C., (1998). Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:1601-1606.
  - Zhou R., Wang Y., Gruber A., Larsson R., Castaños-Vélez E., Liliemark E., (1999). Topoisomerase II-mediated alterations of K-562 drug resistant sublines. *Med. Oncol.* 16:191-198.

