



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CAMBIOS EN EL PROTEOMA DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER HUMANO
BAJO TRATAMIENTO CON DERIVADOS CITOTÓXICOS DE
TIAZOLO[5,4B]QUINOLINAS.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

José Carlos Páez Franco

Tutor Principal

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Facultad de Química

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE
ADSCRIPCIÓN**

Dr. Cerbón Cervantes Marco Antonio
Facultad de Química

Dr. Nora Andrea Gutiérrez Najera
Instituto Nacional de Medicina Genómica

MÉXICO, D. F. Junio, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Reconocimientos

Jurado Asignado

Presidente: Dra. Martha Robles Flores.

Vocal: Dr. Alejandro García Carranca.

Vocal: Dra. Leticia Rocha Zavaleta.

Vocal: Dr. José Pedraza Chaverri.

Secretario: Dra. María Antonieta Chávez González.

El presente trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

- Laboratorio 115 del Edificio E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.
- Laboratorio 206 del Edificio F del Departamento de Biología de la Facultad de Química.
- Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Bajo la tutoría del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero de los siguientes proyectos:

CONACyT (Beca de maestría No. 312915)

DGAPA-PAPIIT IN218910

ICyTDF 234/2010

ASESORES

Dr. Alfonso Lira Rocha

Dra. Nora Andrea Gutiérrez Najera.

Dr. Cerbón Cervantes Marco Antonio

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

**Nada está perdido si se tiene el valor de proclamar que
todo está perdido y hay que empezar de nuevo.**

Julio Cortázar

Agradecimientos

A mi Familia, Doctores, Maestros y Amigos que me ayudaron en la realización de la presente tesis.

Dedicatoria: Para Mañas.

Índice

Capítulo 1. Resumen.....	1
Capítulo 2. Introducción.....	2
Capítulo 3. Antecedentes	5
3.1 Cáncer.....	5
3.2 Mecanismos de daño genético.....	5
3.2.1 Mutaciones.....	6
3.2.2 Adición o pérdida de material genético.....	6
3.2.3 Cambios epigenéticos.....	7
3.3 Signos del Cáncer.....	7
3.3.1 Autosuficiencia en señales de crecimiento	8
3.3.2 Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento	9
3.3.3 Evasión de muerte celular programada (apoptosis).....	9
3.3.4 Potencial replicativo ilimitado.....	10
3.3.5 Angiogénesis sostenida.....	11
3.3.6 Invasión de tejidos y metástasis.....	12
3.4 Tratamientos.....	13
3.4.1 Cirugía.....	13
3.4.2 Radioterapia.....	13
3.4.3 Terapia fotodinámica (PDT).....	14
3.4.4 Agentes que modifican la respuesta biológica.....	14
3.4.5 Quimioterapia.....	15
3.5 Mecanismos de acción de fármacos quimioterapéuticos.....	15
3.5.1 Agentes que interactúan con el ADN.....	17
3.5.1.1 Agentes que interactúan irreversiblemente sobre el ADN..	18
3.5.1.2 Agentes que interactúan reversiblemente con el ADN.....	18
3.5.1.3 Agentes que interactúan con el surco menor del ADN.....	19

3.5.1.4 Agentes que interactúan con el surco menor del ADN.....	20
3.5.2 ADN Topoisomerasas.....	21
3.5.2.1 ADN topoisomerasa tipo II.....	22
3.5.3 Inhibición DTi	22
3.5.3.1 Inhibidores catalíticos.....	23
3.5.3.2 Venenos de DTi II.....	24
3.6 Derivados de Acridina.....	26
3.6.1 Tiazolo[5,4-b]quinolinas como bioisómeros de las acridina...28	
3.6.2 D3CIP.....	31
3.7 Estrategias en el descubrimiento de blancos terapéuticos.....	32
3.7.1 Métodos Proteómicos.....	34
Capítulo 4. Planteamiento del problema.....	36
Capítulo 5. Hipótesis.....	38
Capítulo 6. Objetivos.....	39
Capítulo 7. Materiales y Métodos.....	40
Capítulo 8. Resultados	47
Capítulo 9. Análisis de Resultados.....	57
Capítulo 10. Conclusiones.....	61
Capítulo 11. Bibliografía.....	62

1.- Resumen

En la constante búsqueda para el tratamiento del cáncer, el bioisosterismo es punto de partida actual, provocando el surgimiento de un número cada vez más grande de fármacos que, a partir de estructuras comunes, buscan potenciar el efecto de los fármacos “tradicionales”. Esta constante evolución farmacológica se denota en diversos fármacos con acción anticancerígena potenciada, tales como el Cisplatino (oxaliplatino, carbaplatino), la camptotecina (topotecan, irinotecan) y la m-AMSA (AHMA), siendo éste último, la estructura principal de una serie de compuestos derivados del núcleo de tiazol que se han sintetizado en el grupo de trabajo del Dr. Alfonso Lira Rocha. Dentro de los fármacos sintetizados, el D3CIP es el que presenta una IC_{50} más pequeña ($7.46 \mu M$), incluso inferior a la m-AMSA ($9.50 \mu M$). Por esta razón, se empleó el D3CIP para tratar identificar el mecanismo de acción de las tiazoloquinolinas. Se realizaron diversas pruebas, entre las cuales se enumeran las siguientes:

Ensayo ICE.

A grandes rasgos, consiste en identificar si el tratamiento con D3CIP forma intermediarios covalentes DNA-Topoisomerasa, mecanismo por el cual actúa la m-AMSA.

Ensayos de intercalación al ADN.

Se determinó si el D3CIP producía un retraso en la migración de ADN plasmídico debido a una posible intercalación con los ácidos nucleicos. La m-AMSA se intercala al ADN.

Fosforilación de la histona $\gamma H2Ax$.

Esta modificación postraduccional es importante en la reparación de la ruptura del ADN de doble cadena. Esta modificación se ve presente cuando se emplea m-AMSA como agente citotóxico.

A pesar de la semejanza estructural, el D3CIP no presenta un modo de acción similar al de su isómero, ya que no estabiliza los complejos covalentes y no se intercala al ADN. Sin embargo, sí produce una fosforilación en la histona $\gamma H2Ax$, lo que indicaría una posible respuesta a la ruptura del material genético, efecto que se ha podido corroborar con la técnica de TUNEL.

Para determinar el mecanismo de acción y las posibles dianas farmacológicas, se empleó un esquema proteómico (2D-MALDI) en los que se detectaron diferencias en el patrón de proteínas de células HeLa tratadas con DMSO (vehículo), AMSA y D3CIP ($25 \mu M$) a 12 y 18. Las proteínas que se identificaron están relacionadas en procesos apoptóticos bien definidos (ruptura de Ck 18, disminución de protimosina y paratimosina). Así también se identificaron proteínas (NAC α y Calumenina) cuya disminución se encuentran relacionada con una afectación denominada Estrés de Retículo Endoplásmico, la cual, es producto de una respuesta a proteínas desplegadas (UPR por sus siglas en inglés).

2.- Introducción

Cáncer es el nombre colectivo de un grupo de enfermedades que se caracterizan por la pérdida del control de la proliferación a nivel celular. Una de las características más agresivas de la enfermedad es la habilidad de las células cancerosas para diseminarse por el torrente sanguíneo y alojarse en diversos tejidos. Además, las células cancerosas presentan también una pérdida del control de los mecanismos de muerte celular programada, tales como la apoptosis. Dichos mecanismos se activan, por ejemplo, cuando una célula sana sufre daños que le impiden completar su ciclo celular. En general, la muerte celular programada está acompañada de una degradación ordenada de los componentes celulares, de modo que previene la exacerbación de los mecanismos de inflamación, los cuales, cuando ocurren, contribuyen a hacer más extenso el daño tisular.

El control del ciclo celular se da en múltiples puntos del mismo y a diversos niveles, de manera que si la célula detecta fallas irreparables en el proceso, la muerte celular programada se induce y la célula se sacrifica en favor de la salud del organismo completo. En consecuencia, el desarrollo del cáncer implica una acumulación de mutaciones en el material genético de una célula que oblitaren los mecanismos de control tanto de la proliferación celular, como de la muerte celular programada. En este contexto, el desarrollo del cáncer puede verse como un proceso de selección natural en el que algunas células que acumularon suficientes mutaciones dan lugar a una estirpe celular proliferante, en la que la fidelidad de la duplicación del material genético se va reduciendo. Cada nueva generación de células tiene así nuevas mutaciones y persisten aquellas clonas que logran escapar a la muerte celular programada. Estas células pierden también el control de los mecanismos de adhesión celular y, eventualmente, expresan proteínas que les permiten diseminarse por el organismo.

Basados en que el ciclo celular se halla bajo arresto en la mayoría de las células de un humano adulto, el tratamiento de elección para controlar la invasión sistémica por células cancerosas es la llamada quimioterapia antitumoral, que consiste en la administración de fármacos que atacan a células en división. Sin embargo, las células cancerosas proliferan continuamente y sufren mutaciones en cada nuevo ciclo de división celular, por ello, los fármacos para controlar el cáncer no siempre mantienen su efectividad, ya que la aplicación reiterada de un fármaco citotóxico, se convierte en una presión de selección en las clonas celulares resistentes al citotóxico en cuestión. La búsqueda de nuevos medicamentos antitumorales es, pues, una

necesidad de la medicina actual, ya que hace falta una gran diversidad de compuestos que actúen por mecanismos distintos para elevar la posibilidad de atacar a los diversos tipos de cánceres conocidos.

Diversos tipos de medicamentos han sido empleados como antitumorales, entre ellos, los más importantes son los que impiden la reestructuración del citoesqueleto, que tiene lugar durante la Mitosis, los que atacan el metabolismo de producción de precursores de la síntesis de ácidos nucleicos, los que impiden la degradación de proteínas que controlan es ciclo celular y los que atacan diversas proteínas asociadas a los mecanismos de síntesis de ADN.

La tiazolo[5,4b]quinolinas y las imidazo[5,4]quinolinas son una generación nueva de antitumorales potenciales inspirados en la estructura de las acridinas (1). Entre las diversas acridinas estudiadas, sólo la Amsacrina (m-AMSA) y unos pocos derivados de la misma han alcanzado uso en la terapéutica, principalmente en el tratamiento de linfomas malignos y leucemias agudas no linfocíticas (2). Aunque, en teoría, un agente intercalante puede afectar a casi todos los procesos de lectura de la información genética, tales como la duplicación de ADN y la transcripción, las enzimas que se afectan más por este tipo de compuestos son las ADN topoisomerasas, (DTi) de las cuales hay dos tipos principales, la ADN topoisomerasa I (DTi-I), que modifica el superenrollamiento de la doble hélice de ADN en pasos de un sobregiro o subgiro por ciclo catalítico y la ADN topoisomerasa II (DTi-II) que modifica el superenrollamiento de la doble hélice de ADN en pasos de dos sobregiros o subgiros por ciclo catalítico. En el caso de la m-AMSA y otros fármacos denominados venenos de la DTi II, el efecto citotóxico consiste en producir un complejo covalente ternario DTi-II-ADN-Fármaco, de manera que el enlace fosfodiéster en la doble hélice ha sido reemplazado por un enlace entre el extremo 5'-fosfato del ADN y el -OH fenólico de una tirosina en el sitio activo de la enzima. (3).

Debido a su semejanza estructural, el anillo de le tiazolo[5,4b]quinolina se considera isómero de la acridina y, por tanto, los derivados que presenten un patrón de sustitución con los elementos básicos de la m-AMSA (que son esenciales para su citotoxicidad), deberían ser antitumorales relativamente efectivos y actuar como venenos de la DTi II, siempre que otros factores no limiten su acceso al núcleo.

Sin embargo, en experimentos realizados por el grupo de investigación de la Facultad de Química, la correlación entre la actividad citotóxica de los compuestos y su capacidad

intercalante fue pobre (1,4). Además, tampoco se encontró una correlación clara entre la citotoxicidad y la potencia de los compuestos como inhibidores de la DTi II medida *in vitro* (5). Sin embargo, sí se obtuvo evidencia de que las células mueren mediante un proceso de muerte celular programada con características típicas de apoptosis (6).

Los datos anteriores indican que los derivados citotóxicos de tiazolo[5,4b]quinolinas no ejercen su efecto por el mismo mecanismo que la m-AMSA. Por lo tanto, es necesario investigar la respuesta de las líneas tumorales en otro conjunto más amplio de posibles blancos terapéuticos. Para este fin, las estrategias proteómicas son de gran utilidad, ya que permiten detectar cambios en los niveles de proteínas, ya sea causadas por alteraciones en su síntesis, su degradación y /o por modificaciones postraduccionales. En función de los cambios que ocurran por la incubación de los derivados citotóxicos en líneas de cáncer humano, será posible plantear posibles mecanismos de acción de los compuestos.

3. Antecedentes

3.1 Cáncer

La promoción y restricción del crecimiento normal de una célula depende de un balance de señales finamente controlado, de tal modo, que la proliferación y la diferenciación ocurran de una manera ordenada y sólo cuando sean necesarias. Los tumores pueden ser divididos en dos grupos principales: de carácter benigno o maligno. Los tumores benignos rara vez son potencialmente mortales, éstos crecen dentro de una cápsula bien definida que limita su tamaño y mantiene las características de la célula de origen y, por lo tanto, están casi siempre bien diferenciados. Los tumores malignos invaden los tejidos circundantes y se extienden a diferentes áreas del cuerpo para generar nuevos crecimientos celulares. Las causas que originan el cáncer pueden ser diversas, entre ellas se encuentran factores genéticos (predisposición genética), la exposición a carcinógenos químicos, radiaciones ionizantes e infecciones bacterianas o virales.

A nivel genético, el cáncer involucra cambios o modificaciones en el genoma de las células, llevados a cabo por factores internos y externos. Este proceso se definió por el descubrimiento de genes mutados (de carácter dominante) que promueven una ganancia de función (conocidos como oncogenes) y de algunos genes recesivos que pierden su función normal cuando son mutados (conocidos como genes supresores de tumores).

A nivel celular, se han propuesto un grupo de reglas que explican la transformación de células normales en células tumorales. Éstas postulan, que hay una serie definida de características bioquímicas (llamadas signos del cáncer) que son comunes en la mayoría y quizás en todos los tipos de cáncer humanos (7).

El proceso de tumorigénesis presenta múltiples etapas y, en cada paso, se reflejan cambios genéticos que promueven una transformación progresiva de células normales a células tumorales. Diversos estudios muestran que los genes en células transformadas van desde pequeñas mutaciones puntuales (cambios en una sola base en el ADN) hasta problemas mayores como translocaciones cromosómicas.

3.2 Mecanismos de daño genético.

La formación de un tumor está precedida de cambios en la secuencia y/o estructura (mutaciones, adiciones o pérdidas de ADN o cambios epigenéticos) que promueven un mal funcionamiento de los sistemas de control dentro de la célula.

3.2.1 Mutaciones.

Las mutaciones genéticas pueden ocurrir de muchas formas. En una mutación puntual, sólo una base es alterada, resultando en un nuevo codón que puede producir un cambio en un aminoácido de la proteína, alterando su función normal. Esta proteína podría ser crítica para el estado proliferativo (por ejemplo una proteína supresora de tumores).

En una mutación por translocación, un segmento de ADN se mueve de una región génica a otra. En este caso, al quedar en otro contexto, la regulación de la expresión de dicho gen se altera. Dependiendo de la manera en que el ADN se recombine durante la translocación, la proteína podría no sólo perder su regulación, sino también su función, contribuyendo a un proceso tumorigénico. Los genes originales (sin cambios) son conocidos como protooncogenes. Cuando estos genes resultan alterados por mutaciones como las ya mencionadas, pueden sufrir cambios en su función y contribuir al proceso tumorigénico (8).

Otros genes tienen funciones relacionadas con la restricción de los procesos proliferativos y/o la detección de problemas en la célula. Cuando estos tipos de genes funcionan normalmente, evitan que las células progresen hacia cáncer. Estos genes se conocen como genes supresores de tumores (8).

3.2.2 Adición o pérdida de material genético.

Durante procesos tales como la replicación y reparación, las secuencias que forman un gen pueden ser accidentalmente añadidas o eliminadas. Estos cambios pueden tener efectos similares a los anteriores, por ejemplo, un corrimiento del marco de lectura, que sustancialmente produciría proteínas seriamente mutadas y que, si están involucradas en el control del crecimiento y proliferación celular, podrían tener un efecto importante en la tumorigénesis (9).

3.2.3 Cambios epigenéticos

El control epigenético representa a una serie de mecanismos que regulan la expresión génica, siendo estos procesos independientes de cambios en la secuencia de ADN. Ésta es un área reciente en la investigación del cáncer y reviste gran interés, pues su papel en la tumorigénesis resulta muy relevante. En términos generales, las células cancerígenas presentan cambios en las marcas epigenéticas del ADN, además de cambios puntuales, inserciones, ablaciones o translocaciones. Estos cambios alteran los patrones de expresión génica, pudiendo ocurrir a través de la metilación del ADN, así como la metilación, acetilación o fosforilación de las histonas y otras proteínas alrededor de las cuales el ADN se enrolla para formar la cromatina. Poco se sabe acerca de cómo estas modificaciones químicas se producen en el ADN de las células cancerosas, pero es claro que pueden afectar los patrones de expresión de los oncogenes o genes supresores de tumores. Por ejemplo, la metilación del ADN induce "silenciamiento epigenético" o la pérdida de expresión de los genes supresores de tumores, provocando que las células normales o dañadas se transformen en células cancerosas (8), en lugar de sufrir diferenciación celular o transitar hacia la muerte celular programada.

3.3 Signos del Cáncer

Weinberg ha sugerido que la mayoría de las células que se transforman para desarrollar un proceso tumoral adquieren seis modificaciones esenciales que, colectivamente, inducen este comportamiento (Fig. 1). Estas son:

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento
- Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento
- Evasión de muerte celular programada (apoptosis o autofagia)
- Potencial replicativo ilimitado
- Angiogénesis sostenida
- Invasividad de tejidos y metástasis

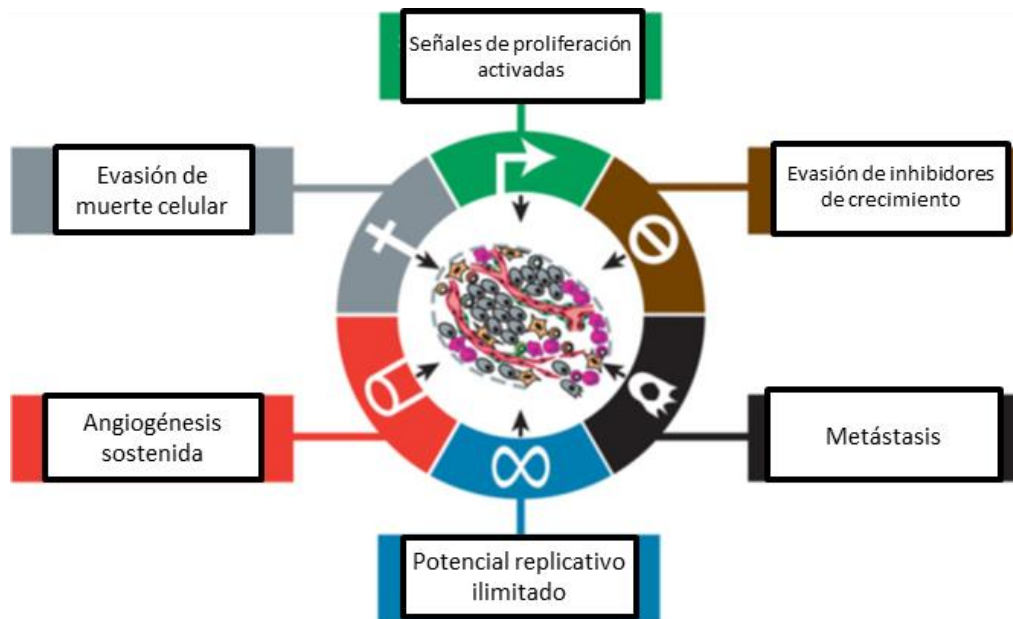


FIGURA. 1. Modificaciones esenciales para el desarrollo de un proceso tumorigénico (7).

3.3.1 Autosuficiencia en señales de crecimiento:

El rasgo fundamental de las células con carácter a desarrollar tumores es la de contar con la habilidad de una proliferación constante. Las células normales controlan su respuesta a las señales de crecimiento otorgadas por el entorno celular, de esta forma se asegura la homeostasis del número de células y el mantenimiento de la estructura normal de un tejido. El control del estado proliferativo (entrada al ciclo celular) está desregulado en prácticamente todos los tipos de cáncer. Dichas modificaciones pueden adquirirse por diferentes vías, por ejemplo, las mismas células cancerígenas pueden producir los ligandos de sus receptores para factores de crecimiento, dando lugar a una estimulación autocrina constitutiva de proliferación. Alternativamente, las células cancerígenas pueden enviar señales a las células normales que las circundan, para que éstas le provean de moléculas señalizantes, por ejemplo, factores de crecimiento (10).

Las vías de señalización asociadas a los receptores pueden ser modificadas también. Si se aumenta la cantidad de receptores expresados membranalmente, se producen células hiperresponsivas a su ligante, siendo esta respuesta dependiente de la cantidad de receptores capaces de señalizar.

Otras vías alternas para el crecimiento celular son las que resultan de una proliferación independiente de la disponibilidad de factores de crecimiento. Por ejemplo, que una mutación ocasione que el receptor se encuentre en un estado permanentemente activado, o que se

encuentren mutados los componentes de señalización que operan río abajo del receptor, generando una estimulación constitutiva y eliminando la necesidad de factores de crecimiento.

3.3.2 Insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento

Además de las señales que promueven el crecimiento, las células cancerígenas deben implementar mecanismos que inactiven los programas que inhiben el crecimiento celular, siendo estas funciones mediadas por los genes conocidos como “supresores de tumores”. Hay muchas proteínas que actúan proporcionando señales para detener el ciclo celular anormal, de entre ellas, RB y TP53 son las mejor caracterizadas. Estos genes, operan como controles centrales de circuitos regulatorios que gobiernan las decisiones celulares a proliferar o, alternativamente, activar la senescencia y los programas de muerte celular. La proteína RB transduce señales de inhibición del crecimiento que se originan principalmente fuera de la célula. La vía asociada a RB integra señales de fuentes extracelulares e intracelulares y, en respuesta, puede estimular a la célula a continuar a través del ciclo celular, o detenerlo (11). En cambio, TP53 recibe respuestas de estrés en el entorno intracelular, entre las cuales, si el daño al genoma o a las mitocondrias es elevado, o si los niveles de nucleótidos, glucosa u oxigenación son sub-óptimos, TP53 puede detener el ciclo hasta que los niveles de las condiciones celulares sean normalizados. Alternativamente, si las señales indican un daño irreparable del material genético, se pueden desencadenar procesos de muerte celular programada.

3.3.3 Evasión de muerte celular programada (apoptosis)

La maquinaria apoptótica está compuesta de sistemas reguladores río arriba y de componentes efectores río abajo (12). Los sistemas reguladores están divididos en dos circuitos principales: uno que recibe y procesa señales extracelulares de muerte celular (sistema extrínseco, de entre ellos el sistema Fas Ligando/ Receptor Fas) y el otro que detecta señales de origen intracelular (programa intrínseco). Cada sistema conlleva a la activación de proteasas normalmente inactivas (caspasas 8 y 9, respectivamente), que promueven una cascada de proteólisis en las que los componentes celulares son parcialmente degradados y empaquetados, para que después sean eliminados por células vecinas o por células fagocíticas profesionales.

La promoción del evento apoptótico está regulada por sistemas efectores que establecen un balance entre los mecanismos disparadores y los mecanismos inhibitorios de esta forma de muerte celular. La mayoría de estas vías involucran a miembros de la familia regulatoria Bcl-2

(12). El miembro Bcl-2 y sus proteínas cercanas (Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1) actúan inhibiendo la apoptosis, generalmente mediante la unión e inhibición de la actividad de dos proteínas proapoptóticas: Bax y Bak. Cuando son liberadas de sus contrapartes antiapoptóticas, Bax y Bak afectan la integridad de la membrana mitocondrial, produciendo la liberación de moléculas con actividades proapoptóticas, siendo la más importante el citocromo C.

El citocromo C liberado activa una cascada de caspasas que actúan vía proteólisis, iniciando los múltiples cambios celulares que acompañan al programa apoptótico. Si las células dañadas desencadenan apoptosis, se previene su progresión hacia el cáncer.

Las células tumorales emplean varias estrategias para limitar los procesos apoptóticos. Entre las más comunes se encuentran, la pérdida de actividad de TP53, el incremento en la expresión de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-XL y la disminución de factores pro-apoptóticos como Bax, Bim y Puma (12).

3.3.4 Potencial replicativo ilimitado

La mayoría de las células normales en un organismo cuentan con un número limitado de ciclos de división celular. Esta limitación se asocia a dos barreras principalmente: La senescencia, que es la entrada a un estado irreversible de no proliferación, y el estado de crisis, el cual involucra muerte celular. El estado de senescencia se induce cuando las células en cultivo son sometidas a ciclos repetidos de proliferación. Las células que superan la barrera de senescencia, entran a una nueva fase llamada de crisis, en la cual, la mayoría de las células resultantes mueren. En raras ocasiones, algunas células en la fase de crisis emergen e incrementan su capacidad proliferativa. A esta transición se le llama inmortalización.

Múltiples líneas de evidencia indican que los telómeros (extremos de los cromosomas que contienen repeticiones de secuencias hexanucleotídicas) están envueltos en la capacidad de un estado ilimitado de proliferación (13).

Los telómeros de células no inmortalizadas sufren un acortamiento progresivo y eventualmente pierden la capacidad de proteger los extremos cromosómicos de fusiones con otras regiones de ADN. En función del tamaño de los telómeros, se dicta el número de generaciones sucesivas que puede generar una célula, antes de que los telómeros sean desprotegidos y se promueva la entrada a la fase de crisis.

La telomerasa es la enzima que añade los segmentos repetidos de ADN al final de los cromosomas, estando casi ausente en células no immortalizadas, pero expresada en cantidades funcionales en la mayoría de las células espontáneamente immortalizadas. Mediante la extensión de ADN telomérico, las telomerasas son capaces de contrarrestar la pérdida de regiones teloméricas por ciclo celular.

La actividad de telomerasa en células immortalizadas está relacionada con la resistencia a la inducción a los estados de senescencia y crisis apoptótica. La eventual immortalización de variantes celulares que producen tumores ha sido atribuida a su habilidad de mantener el ADN telomérico en cantidades suficientes como para evitar la senescencia y la apoptosis. Este fenómeno es alcanzado por la expresión de telomerasa o, en menor frecuencia, por eventos de recombinación (14).

3.3.5 Angiogénesis sostenida

Como los tejidos normales, los tumores requieren de nutrientes y oxígeno, así también, deben contar con la capacidad para desechar metabolitos secundarios y dióxido de carbono. La neovascularización asociada al proceso tumorigénico ayuda a sortear estas necesidades. Durante la etapa adulta, los mecanismos de vascularización se encuentran normalmente quiescentes, siendo encendidos temporalmente en casos especiales como la cicatrización de heridas y los ciclos reproductivos femeninos. En contraste, durante la progresión del tumor, el programa de angiogénesis se prende, coadyuvando a la neovascularización del tejido neoplásico (14).

Se sabe que el proceso angiogénico se encuentra gobernado por factores que inducen o previenen la angiogénesis (15). Algunos de estos reguladores, son proteínas señalizadoras que se unen a receptores de membrana, estimulando o inhibiendo el crecimiento endotelial. De entre los inductores e inhibidores, respectivamente el Factor de Crecimiento Endotelial A (VEGF-A) y la trombospodina 1 (TSP-1) son los principales.

El gen VEGF-A codifica un factor de crecimiento que estimula a los receptores celulares involucrados en orquestar el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo postnatal y embrionario. Los receptores de VEGF-A son tres tirosina cinasas (VEGFR 1-3) que están reguladas a múltiples niveles. La expresión de VEGF-A está controlada positivamente por la vía de transducción que responde a hipoxia, así como por otras factores oncogénicos (16). Adicionalmente, VEGF puede ser secuestrado en la matriz extracelular en formas latentes,

pudiendo ser activada y liberada por metaloproteasas degradadoras de la matriz (p.ej. MMP-9. 17). Los factores de crecimiento fibroblástico han sido implicados también en procesos angiogénicos (15).

La proteína TSP-1 es pieza clave en el balance angiogénico debido a su unión a receptores transmembranales en células endoteliales; produciendo señales supresoras a los estímulos pro-angiogénicos (18).

Los vasos sanguíneos dentro de los tumores son producidos por una angiogénesis activa. Con frecuencia, los tumores presentan una neovascularización marcadamente anómala, con ramificaciones excesivas, vasos distorsionados y ampliados, flujos de sangre irregulares, micro-hemorragias y niveles anormales de células endoteliales (19).

3.3.6 Invasión de tejidos y metástasis

Las células cancerosas, desarrollan típicamente alteraciones en su forma y en su acoplamiento con otras células y/o con la matriz extracelular. La alteración más caracterizada es la pérdida de la E-caderina, proteína muy importante en la adhesión célula-célula.

Mediante la formación de uniones con las células epiteliales adyacentes, la E-caderina ayuda a ensamblar las capas celulares y a mantener la quiescencia celular. Se ha correlacionado una disminución en la invasión y la metástasis cuando existe una incrementada expresión de E-caderina, mientras que la reducción en su expresión promueve fenotipos invasivos (20,21).

Frecuentemente, se observa una disminución en la expresión de E caderina y/o mutaciones inactivantes de dicha proteína en carcinomas humanos, lo que indica su papel clave en la supresión de la angiogénesis (20,21). Adicionalmente, la expresión de genes que codifican otras moléculas de adhesión se encuentran alteradas en carcinomas altamente agresivos.

Por ejemplo, la N-caderina, que normalmente se expresa en neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis, está sobreexpresada en muchas células cancerígenas invasivas (21).

El proceso de invasión y metástasis ha sido esquematizado como una secuencia de pasos, a menudo llamado cascada de invasión-metástasis (22).

Estos pasos inician con una invasión local, seguido de la intravasación a los vasos sanguíneos o linfáticos con el consecuente tránsito de las células cancerosas a través de estos sistemas.

Posteriormente, se da la extravasación al parénquima o a tejidos distales, seguidas de un crecimiento de lesiones micrometastásicas, siendo este último paso denominado “colonización”.

3.4 Tratamientos

El tratamiento del cáncer a menudo involucra más de una aproximación, y la estrategia adoptada depende principalmente de la naturaleza del cáncer y de la etapa en la que éste se encuentra. Los principales tratamientos hoy en día son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Sin embargo, otras aproximaciones como la terapia fotodinámica (PDT), la vacunación y la terapia génica están en desarrollo.

3.4.1 Cirugía

Si el tumor es pequeño y razonablemente bien definido, éste puede ser fácilmente retirado quirúrgicamente. Sin embargo, el empleo adicional de quimioterapia o radioterapia es a menudo requerido para eliminar cualquier célula que se haya mantenido o haya desarrollado metástasis. Alternativamente, tratamientos de radioterapia o quimioterapia pueden ser administrados antes de la cirugía, a fin de reducir el tumor o facilitar su remoción completa. Generalmente, cuando es posible, un área grande de tejido sano que rodea al tumor se remueve durante la cirugía, esto, para asegurar una erradicación completa de las células cancerígenas.

3.4.2 Radioterapia

Este método involucra el uso de rayos X o radiofarmacéuticos (radionúclidos) que actúan como fuente de radiación. El haz de neutrones es también utilizado en algunos procedimientos experimentales, aunque son menos comunes debido al alto costo y a la escasa disponibilidad del equipo requerido. En la terapia de rayos X, la radiación es dispuesta localmente en un rayo altamente enfocado, a fin de evitar daño al tejido normal. Aunque la terapia de rayos X es una técnica bien establecida, la investigación actual busca un tratamiento más efectivo en términos de duración y frecuencia de exposición.

Los últimos desarrollos tecnológicos incluyen el uso de múltiples fuentes de rayos X bajo guía computacional, que convergen y se enfocan en el tumor con un alto grado de precisión.

Los radionúclidos en uso, incluyen el cobalto 60 (^{60}Co), el oro 198 (^{198}Au) y el yodo 131 (^{131}I). El cobalto-60 se emplea en bombas de cobalto cuya radiación se aplica sobre el tumor en forma tópica. El ^{198}Au generalmente se concentra en el hígado, mientras que el ^{131}I se emplea para el tratamiento de cáncer de tiroides, ya que el yoduro (la forma química como se administra) se

acumula en esta glándula. Una proporción significativa de tumores son hipóxicos (cuentan con niveles bajos de oxígeno) y, por tanto, son menos sensibles al daño por radiación, ya que esta terapia funciona a través de la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno que dañan al ADN y a otras macromoléculas. Por eso, antes y durante la terapia de radiación se administra oxígeno para sensibilizar a las células tumorales.

3.4.3 Terapia fotodinámica (PDT)

Esta terapia involucra inicialmente la administración de un fotosensibilizador, por ejemplo, un derivado de porfirina (Photofrina TM), el cual tiene cierto grado de selectividad para tejidos tumorales. Después que el agente es localizado, el tumor es irradiado con una fuente de luz intensa a una longitud de onda apropiada (usualmente un láser), que excita la molécula de Photofrina. Durante el decaimiento al estado basal, la photofrina reacciona con el oxígeno, generando especies reactivas de oxígeno altamente citotóxicas provocando daño celular. Es evidente que, en la medida de lo posible, la exposición de células sanas a la radiación debe evitarse, ya que los daños al ADN pueden conducir a nuevos eventos de tumorigénesis.

3.4.4 Agentes que modifican la respuesta biológica.

Entre estos se incluyen agentes diversos, tales como anticuerpos, interferones, interleucinas, enzimas, vacunas, y otro tipo de estimulantes inmunológicos.

Se ha encontrado por ejemplo, que muchos de los tumores de cáncer de mama expresan antígenos específicos del tumor, lo que ha promovido el desarrollo de anticuerpos que reconocen estos antígenos con fines terapéuticos (p.ej. Herceptina). Estos anticuerpos tumor específicos, pueden ser conjugados con ciertas moléculas (por ejemplo radionúclidos), para ser específicos del sitio tumoral. Finalmente, la investigación reciente se encuentra dirigida al desarrollo de vacunas que puedan prevenir el tumor o modificar el crecimiento de tumores establecidos.

En el caso de los tumores inducidos por infecciones virales, el uso de vacunas puede resultar muy efectivo como medida de prevención. Un ejemplo reciente de gran éxito, es el desarrollo de una vacuna contra las infecciones por virus del Papiloma Humano (VPH), que, cuando es dado a mujeres jóvenes, parece erradicar el riesgo a desarrollar cáncer de cérvix en la edad madura (23).

3.4.5 Quimioterapia

La quimioterapia involucra el uso de fármacos de bajo peso molecular para destruir el tumor o limitar su crecimiento. De entre estos fármacos, las mostazas de nitrógeno fueron los primeros en ser usados clínicamente.

Una ventaja de la quimioterapia radica en que, después de la administración intravenosa, los fármacos se distribuyen a través de todos los tejidos del cuerpo, teniendo la capacidad de matar células tumorales en áreas protegidas del cuerpo (como el cerebro), células que sufren metástasis y que aún no han colonizado un tejido, o aquellas que se alojan en regiones inaccesibles para el cirujano.

Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los fármacos empleados como agentes citotóxicos tienen mayor efecto sobre células tumorales, éstos también actúan sobre células sanas proliferantes, produciendo efectos adversos tales como: la supresión del crecimiento de células de la médula ósea, lesiones en el tracto gastrointestinal, pérdida del cabello y náuseas. Además, se presenta con frecuencia un desarrollo de resistencia clínica, ya que las células tumorales resistentes al fármaco, son seleccionadas.

La aparición de resistencia clínica es uno de los factores que hacen necesario el continuo desarrollo de nuevos fármacos, particularmente, aquellos que presentan mecanismos de acción novedosos, ya que el empleo de fármacos dirigidos en contra de blancos moleculares diferentes, tendrán poca probabilidad de provocar resistencia cruzada.

Algunos de los nuevos agentes farmacológicos, como los inhibidores de proteínas cinasas, cuentan gran selectividad sobre células cancerígenas.

3.5 Mecanismos de acción de fármacos quimioterapéuticos.

Por su modo de acción los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar de la siguiente manera (24):

- Antimetabolitos.
- Agentes antitubulina.
- Agentes que inhiben vías de señalización para el crecimiento y proliferación celular.
- Agentes que interactúan con el ADN.

Los agentes anticancerígenos tanto en uso clínico como en desarrollo, trabajan a través de una variedad de mecanismos a fin de interferir con el crecimiento celular (Fig. 2). De entre los más empleados, los que interactúan con el ADN vienen a primer término. Algunos actúan bloqueando el proceso de síntesis de ADN (ej. 6-mercaptopurina), mientras que otros son incorporados al material genético e interfieren en sus funciones esenciales (ej. 6-tioguanina). Sin embargo, otros actúan directamente sobre la doble hebra, formando entrecruzamientos intercatenarios (ej. Cisplatino), o intracatenarios (mostazas), intercalándose entre las bases (ej. Mitoxantrona), o interaccionando con el surco menor (ET-387) o el mayor (ej. Temozolomida).

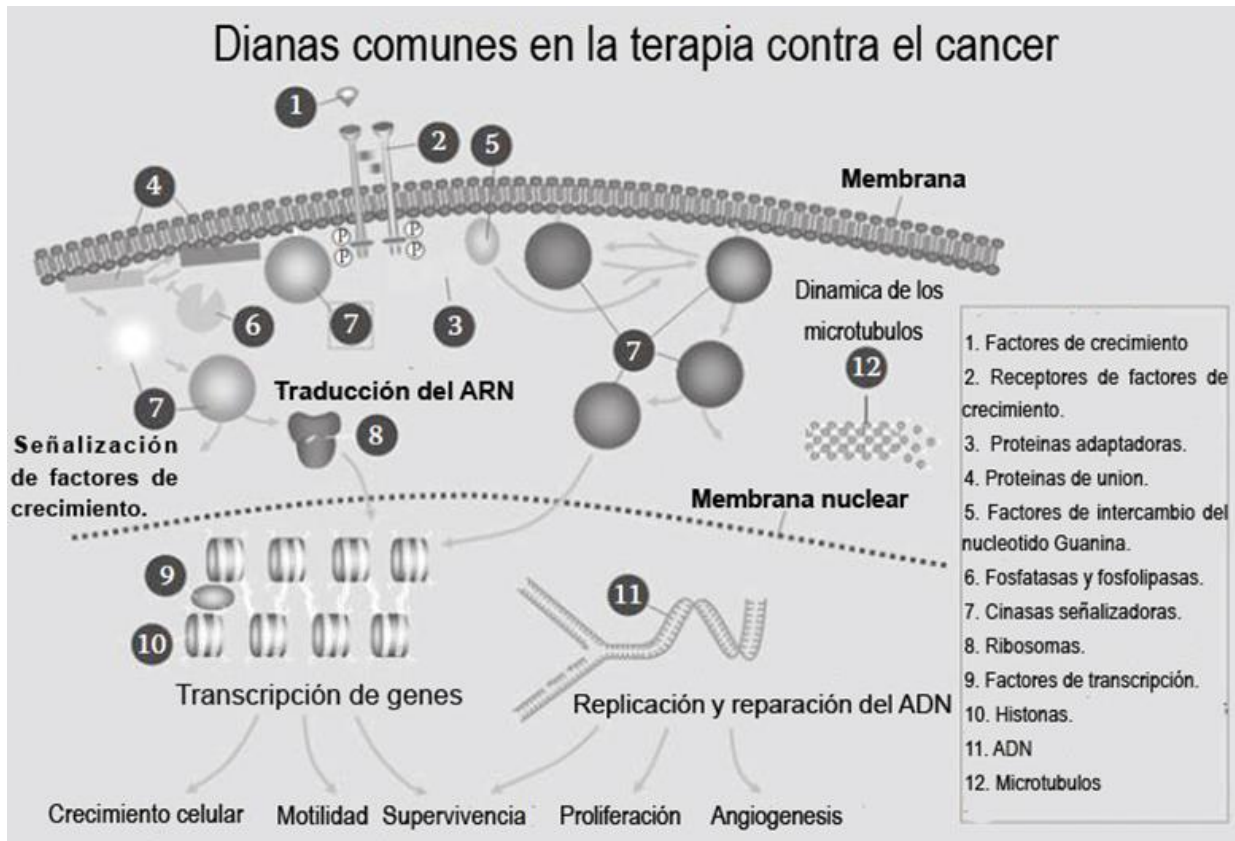


FIGURA 2. Dianas comunes de los agentes antitumorales (24).

Otro tipo de fármacos empleados ampliamente son los denominados antimetabolitos, ya que trabajan interfiriendo con pasos claves de vías biosintéticas (ej. metotrexato).

Los antimitóticos como la vinblastina y el taxol, interfieren con la división celular al interrumpir el funcionamiento normal de los componentes del huso mitótico, ya que interfieren con la dinámica de la tubulina.

Los recientemente desarrollados inhibidores de transducción de señales interfieren con alguna vía de transducción de señales que es importante en el mantenimiento del tumor, por ejemplo, el señalamiento por factores de crecimiento vía tirosincinasas (ej. Iressa y Gleevec). Otros fármacos clasificados como antagonistas o inhibidores de señales hormonales, pueden tener efectos positivos en el tratamiento de tumores, ya que pueden impedir que la estimulación hormonal del tumor promueva su crecimiento. Por ejemplo, los bloqueadores del receptor de estrógenos (tamoxifen) o los inhibidores de la aromatasa que interfieren con la biosíntesis de esteroides (ej. Anastrozol.).

Finalmente, se están desarrollando agentes que actúan en contra de nuevos blancos, como aquellos que interfieren con la función del ARN o que interfieren con interacciones proteína-proteína relevantes en el mantenimiento del tumor (ej. p53/MDM2).

3.5.1 Agentes que interactúan con el ADN.

En términos generales, los mecanismos de acción involucran la interferencia con el procesamiento del ADN, produciendo muerte celular, usualmente a través de la activación de la apoptosis. Aunque algunos de los agentes más simples como los son las mostazas de nitrógeno causan daño al ADN en numerosos sitios del genoma de una forma no específica, algunos de los fármacos nuevos son más específicos. El fármaco SJG 136 reconoce y se une a secuencias específicas del ADN (24, 25). Entre los efectos adversos de los fármacos que interactúan con el ADN se incluyen la alopecia, toxicidad en el tracto gastrointestinal (mucositis y diarrea) y, más seriamente, supresión de la medula ósea. Sin embargo, hay dos problemas muy importantes empleando estos fármacos. El primero, la gametogénesis puede ser severamente afectada, pudiéndose observar subsecuentes problemas de esterilidad. Segundo, el uso prolongado de estos fármacos en combinación con radioterapia puede incrementar el riesgo de leucemia aguda no linfocítica en etapas posteriores, presumiblemente por el daño al material genético causado por el uso constante de los tratamientos.

3.5.1.1 Agentes que interactúan irreversiblemente sobre el ADN.

Se clasifican en:

Mostazas nitrogenadas

Aziridinas (etileniminas).

Epóxidos.

Metilhidrazinas

Metanosulfatos.

Nitrosoureas.

Trizenos.

Complejos de platino.

Estas moléculas generan radicales de carácter electrófilo que reaccionan con los nucleótidos de carácter nucleofílico en el siguiente orden: N⁷ de guanina > N¹ de la adenina > N³ de la citosina > N³ de la timina, siendo la excepción las nitrosoureas como la Nimustina (Fig. 3) (24) las cuales generan sales de diazonio que reaccionan con el O⁶ de la guanina y los átomos de oxígeno de los residuos de fosfato. Los agentes alquilantes promueven la formación de enlaces entre dos hebras complementarias de ADN evitando así su replicación y transcripción.

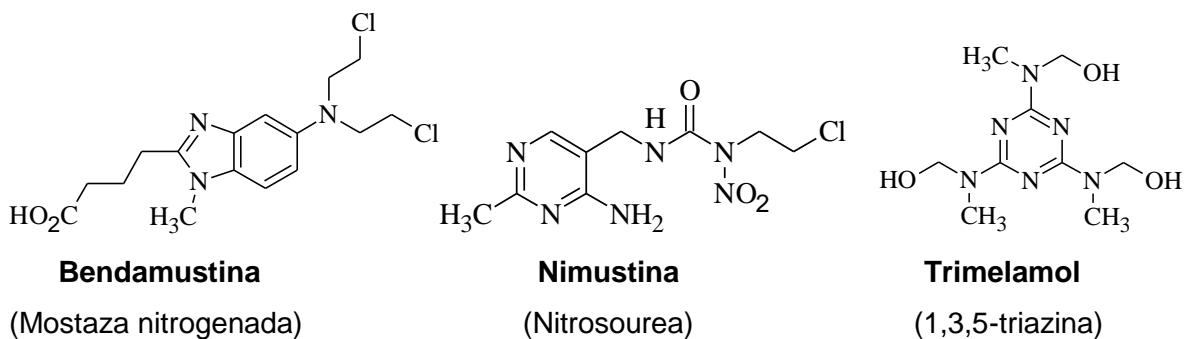


FIGURA 3 Algunos agentes alquilantes (24).

3.5.1.2 Agentes que interactúan reversiblemente con el ADN.

A diferencia de los agentes alquilantes, existe una amplia variedad de compuestos que se unen al ADN de forma reversible (Figura 4).

Las dos formas en que puede interactuar una molécula son:

Unión en el surco menor, la cual no requiere de cambios conformacionales en el ADN y muchas veces presentan una secuencia específica.

Intercalación de moléculas con sistemas aromáticos planares o cuasiplanares entre los pares de nucleótidos, lo que exige una separación entre estos últimos y casi no presentan una secuencia específica.

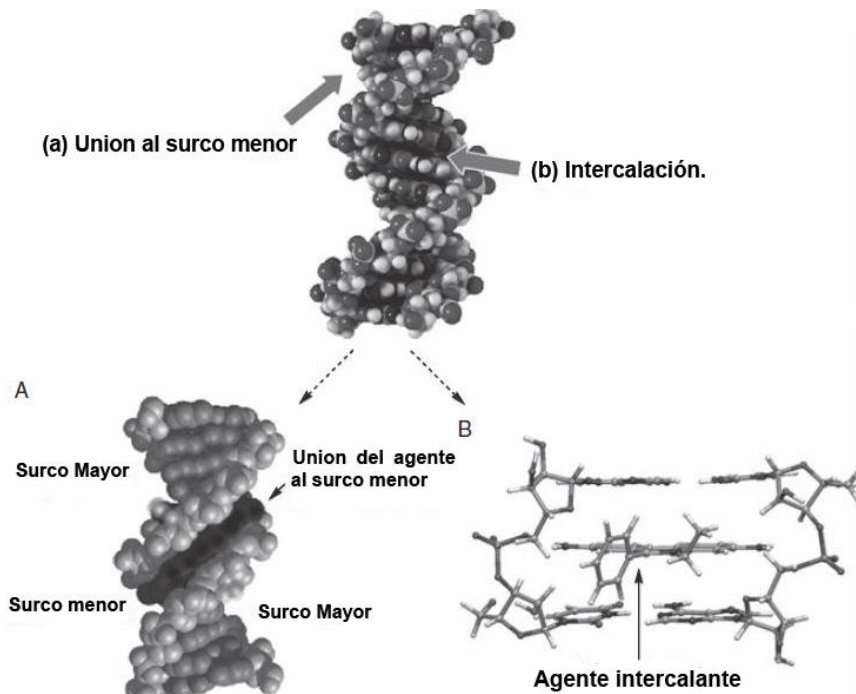


FIGURA 4. Algunas interacciones reversibles con el ADN (24)

3.5.1.3 Agentes que interactúan con el surco menor del ADN.

Mientras en el surco mayor normalmente se unen moléculas grandes como proteínas y oligonucleótidos. El surco menor, por su curvatura y reducido espacio tiene preferencia por moléculas pequeñas. Por esta razón, los compuestos que interactúan en este sitio contienen varios anillos aromáticos enlazados a grupos con un alto grado rotacional como la Distamicina A y el Pibenzimol (Figura 5, 26). La unión al surco menor no requiere de cambios conformacionales en el ADN, siendo la unión estabilizada a través de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de Van der Waals. Los compuestos que actúan así suelen unirse de manera selectiva a secuencias ricas en adenina-timina.

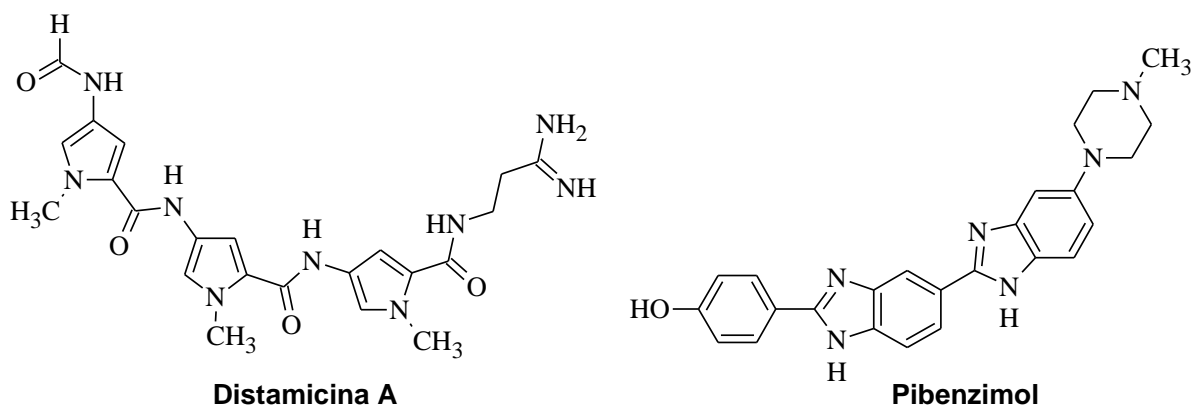


FIGURA 5: Compuestos que interactúan con el surco menor del ADN (26).

3.5.1.4 Agentes intercalantes

Muchos fármacos anticancerígenos de uso clínico interactúan con el ADN a través de la intercalación, que puede ser definido como el proceso por el cual compuestos con sistemas de anillos aromáticos planos o heteroaromáticos son insertados perpendicularmente entre las bases adyacentes al eje de la hélice de la doble cadena (27). Dado que muchos agentes intercalantes típicos contienen tres o cuatro anillos fusionados que absorben la luz en la región UV-Visible del espectro electromagnético, estos compuestos son conocidos como cromóforos. Detrás del cromóforo, otros sustituyentes en la molécula intercalante pueden influenciar ampliamente el mecanismo de unión, la geometría del complejo ADN-ligando y la selectividad de la secuencia.

Para acomodar el ligando, el ADN debe sufrir cambios conformacionales que involucran un incremento en la separación vertical entre las pares de bases, esto, con la finalidad de crear una cavidad para el cromóforo entrante. La doble hélice, por tanto, resulta parcialmente abierta (Fig. 10) (28) lo que conduce a distorsiones en la columna vertebral de azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos y cambios en el ángulo de giro entre las pares de bases sucesivas. Una vez que el fármaco ha sido introducido entre ambas hebras, la estabilidad del complejo es mediada por un número de interacciones no covalentes, incluyendo fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, efectos hidrofóbicos e interacciones Pi:Pi (29).

Generalmente, las especies catiónicas son más eficientes al intercalarse, ya que estos compuestos interactúan mejor con los fosfatos presentes en el ADN en los estadios iniciales y también porque la intercalación libera contraiones asociados con el grupo fosfato (como el Na^+), provocando un efecto llamado “polielectrolito”, siendo este fenómeno una fuerza muy importante para provocar la intercalación, ya que disminuye las interacciones repulsivas entre las cargas

muy próximas de los contraiones (28). De hecho, muchos agentes intercalantes están cargados positivamente o contienen grupos básicos que pueden ser protonados bajo condiciones fisiológicas.

La intercalación es el primer paso en una serie de eventos que eventualmente producirá sus efectos biológicos. Los cambios estructurales inducidos por la intercalación en el ADN conducen a la interferencia en el reconocimiento y función de las proteínas asociadas con el material genético, como los son las polimerasas, factores de transcripción, sistemas de reparación y especialmente las topoisomerasas (29).

3.5.2 ADN Topoisomerasas

Las ADN Topoisomerasas son enzimas que actúan sobre la topología del ADN. Su actividad consiste en la interconversión de formas de ADN que difieren en su nivel de torsión interna de la doble hélice, a través de cambiar el llamado número de enlace del ADN (Fig. 6). Dependiendo de si el número de enlace es modificado en pasos de 1 o de 2, estas enzimas se designan como DTi I y DTi II.

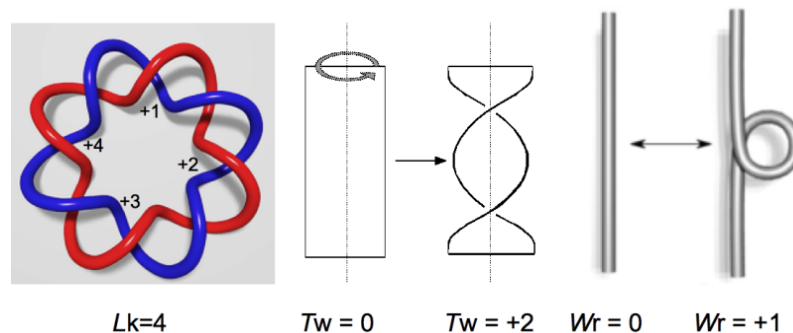


FIGURA 6. Esquema que ilustra las propiedades topológicas de la doble hélice de ADN (44).

Su actividad las hace esenciales para procesos tales como la duplicación del ADN, la transcripción y la recombinación, así también en la condensación y segregación de los cromosomas. En las teorías sobre el origen de la vida, se considera que estas enzimas habrían aparecido durante la formación del llamado mundo moderno de ADN (30), habiéndose diversificado en familias y subfamilias de proteínas con actividad de DTi, en ambos tipos de enzimas (I y II). Estas familias han sido descritas dentro de los tres tipos de dominios celulares (Archaea, Bacteria y Eukarya), así como también en genomas virales, tanto de virus que infectan eucariontes como de bacteriófagos.

3.5.2.1 ADN topoisomerasa tipo II

Las ADN topoisomerasas tipo II introducen rupturas en la doble cadena en un ADN dúplex, forzando el paso de otro dúplex a través de la ruptura (31). La ruptura del ADN, el almacenamiento de energía y las reacciones de religación son químicamente similares a las topoisomerasas tipo I, con la formación de la unión fosfotirosilo entre el ADN y la enzima. Sin embargo, en las DTi tipo II, las dos cadenas del ADN dúplex son rotas en una reacción concertada. En tanto que las DTi I pueden unirse al extremo 5' (DTi I α) o al extremo 3' (DTi I B y IC), todas las DTi II se unen transitoriamente al extremo 5' del ADN.

Todas las DTi II pueden desencadenar, formar y/o remover nudos en ADN dúplex circular y alterar la superhelicidad del ADN relajando superenrollamientos positivos o negativos. La girasa, una topoisomerasa II α en bacterias, parece ser la única que puede superenrollar negativamente ADN dúplex covalentemente cerrado (32).

Las DTi II son esenciales en todas las células para llevar a cabo la segregación cromosómica, después de la duplicación del ADN y antes de la división celular, siendo algunas de ellas blancos terapéuticos para el tratamiento contra el cáncer. Las DTi II están organizadas dentro de dos familias, Topoisomerasa II α y II β . (30)

3.5.3 Inhibición ADN Topoisomerasa II

Los fármacos que tienen como blanco la DTi II se encuentran divididos en dos grandes clases. La primera clase enumera muchos de los agentes clínicamente activos, incluyendo etopósido, doxorubicina y mitoxantrona, los cuales promueven el incremento en los niveles de los complejos covalentes DTi II- ADN. Estos compuestos generan daños que incluyen rupturas en las hebras de ADN y proteínas covalentemente unidas al ADN, los cuales se han denominado como "venenos de DTi II" (*topoisomerase poisons*). Una segunda clase de compuestos inhibe la actividad catalítica de la enzima, pero no genera incrementos en los niveles de complejos covalentes de DTi II. Esta segunda clase de agentes se cree que produce muerte celular a través de la eliminación de actividades enzimáticas esenciales y son, por tanto, llamados inhibidores catalíticos (Fig. 7).

3.5.3.1 Inhibidores catalíticos.

La clase más importante de estos compuestos son las bisdioxopiperazinas, que incluyen a ICRF-159, ICRF-187 y MST-16. Estos fármacos tienen dos actividades: son potentes agentes quelantes y bloquean la DTi II en el ciclo catalítico justo después del cruce de la hebra pero antes de la hidrólisis del segundo ATP (33). Las bisdioxopiperazinas tienen una modesta actividad antitumoral, siendo usadas principalmente para reducir la cardiotoxicidad cuando se usan antraciclinas, sin embargo, son importantes herramientas para estudiar los efectos en la inhibición de DTi II, ya que son los inhibidores más específicos que no actúan como venenos de la DTi II.

Recientemente, se sintetizó un inhibidor competitivo de ATP que presentó actividad como inhibidor de ambas isoformas de DTi II (34). Aunque la actividad citotóxica de este compuesto no se cuantificó, QAP1 puede reducir las respuestas de daño al ADN inducidas por la doxorubicina (que es un veneno de DTi II). El uso terapéutico de inhibidores catalíticos como agentes anticancerígenos está limitado a los compuestos aclarubicina y sobuzoxano.

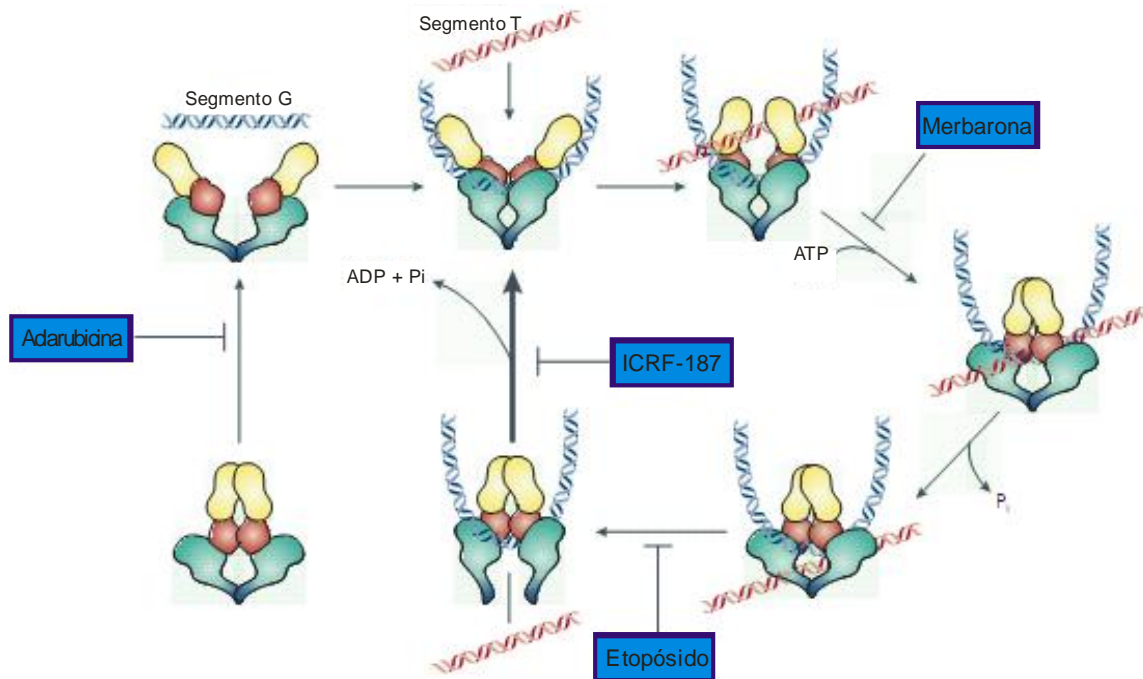


FIGURA 7. Mecanismos de inhibición de DTi II. Topoisomerasa II puede ser inhibida en diferentes puntos del ciclo de reacción (35).

3.5.3.2 Venenos de DTi II

Los agentes que incrementan los niveles de los complejos de ruptura son conocidos como “venenos de DTi II”, dado que éstos convierten a la enzima en una potente toxina celular. Los venenos de DTi II varían dramáticamente en sus propiedades de unión al ADN. Por ejemplo, el etopósido es un compuesto no intercalante que presenta una débil interacción con el ADN en ausencia de DTi II (35). Igualmente, la genisteína y las quinolonas son compuestos no intercalantes. En contraste la amsacrina, la doxorubicina y mitoxantrona son de naturaleza intercalante, siendo los últimos dos compuestos los que presentan mayor afinidad por los ácidos nucleicos (Fig.8).

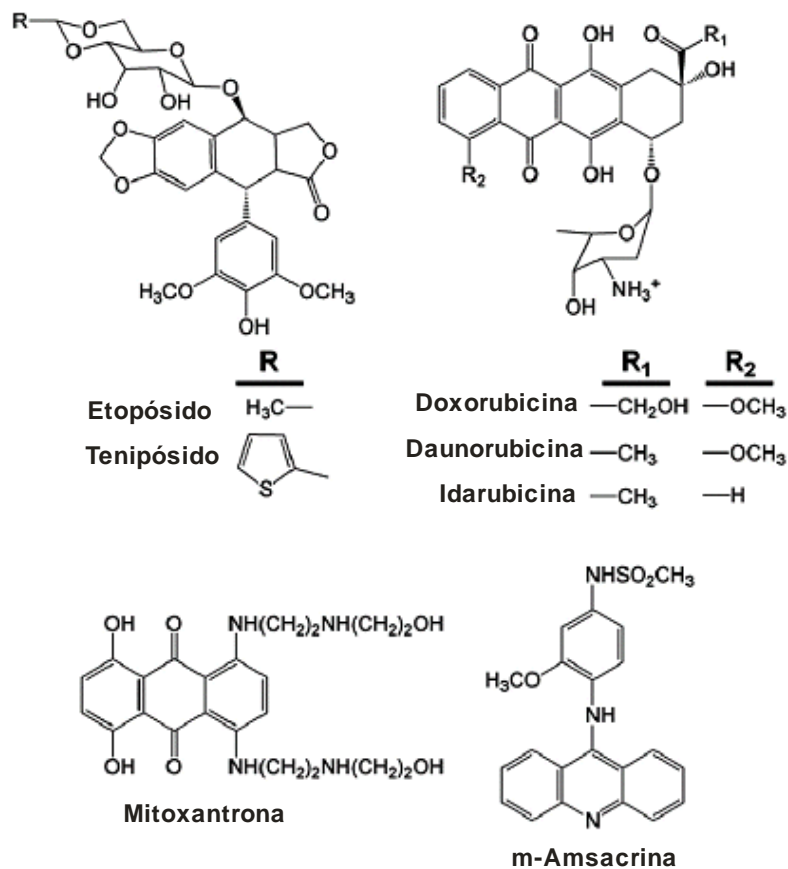


FIGURA 8. Estructura de fármacos anticancerígenos que actúan en contra de DTi II (35).

Los venenos de DTi II incrementan la cantidad de los complejos de ruptura por dos mecanismos. El primero se encuentra definido por la incapacidad de la enzima en religar el ADN que está unido a la enzima (36,37). Estos agentes no sólo incrementan el nivel de los complejos de ruptura, también incrementan el tiempo de vida de estos complejos. Este tipo de

inhibición ha sido denominado como inhibición de interfase, dado que el fármaco interactúa en la interfase entre la proteína y el ADN (38). En este modelo, el fármaco se coloca entre las bases -1 y +1, afectando la geometría requerida para la religación después del paso de la hebra.

Esta localización de los venenos de DTi II se determinó mediante el análisis de secuencias de ruptura, las cuales fueron obtenidas por el tratamiento de enzima purificada con fragmentos de ADN definidos en presencia de venenos de DTi II. Una demostración directa para determinar la localización del fármaco, se obtuvo usando un análogo fotoactivable de la m-AMSA y DTi II del fago T4 (39). La DTi II del fago es más similar en sus reacciones y en el espectro de inhibidores a la DTi II eucariota que la enzima tipo II procariota. El derivado de la m-AMSA se unió a la base 1+ en relación a la ruptura del ADN, sugiriendo intercalación en el sitio de ruptura. Dado que el análogo fotoactivable de la m-AMSA no reacciona significativamente con el ADN en ausencia de DTi II, la enzima juega una función importante en estabilizar la unión del compuesto, promoviendo su interacción con el ADN. Aunque no se ha obtenido información directa con otros agentes intercalantes, se ha encontrado una preferencia clara en las bases de los sitios de corte, con mayor preferencia en las bases -1 y +1 (40). Estos resultados son consistentes con la presencia del intercalador en la interfase proteína-ADN, lo que implica cambios en la geometría de los residuos requeridos para religar la hebra rota; es probable que este modelo también se extienda a los venenos de DTi II no intercalantes. Para venenos no intercalantes, un complejo binario fármaco-proteína podría ser importante para colocar el fármaco en el sitio donde el complejo terciario puede ser formado.

Es de hacer notar que la ruptura en ambas hebras de la doble cadena no es un requerimiento estricto para que un veneno de DTi II sea efectivo; la ruptura en una sola cadena puede provocar citotoxicidad también.

El segundo tipo de compuestos parecen no bloquear el paso de religación, en vez de eso generan altos niveles de complejos covalentes DTi II- ADN estimulando el paso de ruptura (41). Este modo de acción no es explicado por el modelo de inhibición de interfase, y sugiere que algunos agentes pueden causar perturbaciones en el ADN que pueden facilitar la reacción de ruptura.

3.6 Derivados de acridina

La acridina es un compuesto orgánico heterocíclico estructuralmente relacionado con el antraceno, con uno de sus carbonos centrales sustituidos por un nitrógeno (Fig. 9). La acridina y sus derivados se unen al ADN y al ARN de acuerdo a su habilidad de intercalación.

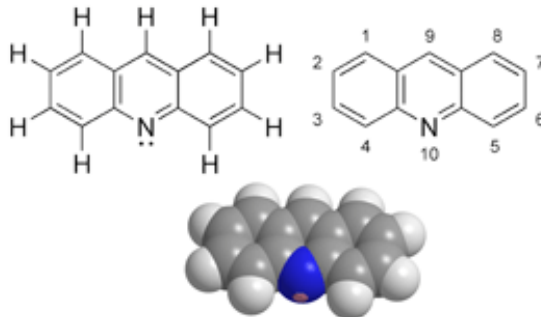


FIGURA 9. Estructura de la Acridina

El modo de intercalación de las moléculas de acridina involucra la unión de los anillos tricíclicos entre las pares de bases adyacentes en el dúplex del ADN (27). El interés en estos intercalantes ha llevado al desarrollo de la amsacrina (m-AMSA), un fármaco usado en el tratamiento de linfomas malignos y leucemias agudas no linfocíticas (42). La AMSA (4'-(9-acridinilamino)-metanosulfona-manisidina) o m-AMSA es una anilinoacridina usada principalmente en el tratamiento de leucemia en niños. El principal mecanismo de acción de m-AMSA es la formación de un complejo terciario con el ADN y DTi II, atrapando el complejo de ruptura e inhibiendo el paso de religación. Estudios de resonancia de Raman de m-AMSA con ADN de alto peso molecular indican el modo de unión intercalante (43). Estudios similares con técnicas espectroscópicas de los compuestos terciarios de AMSA con ADN plasmídico y DTi II muestran que las acridinas se intercalan al ADN por medio de interacciones Pi:Pi con las pares de bases y los anillos anilino en el surco menor de la doble cadena (Fig. 10) (43).

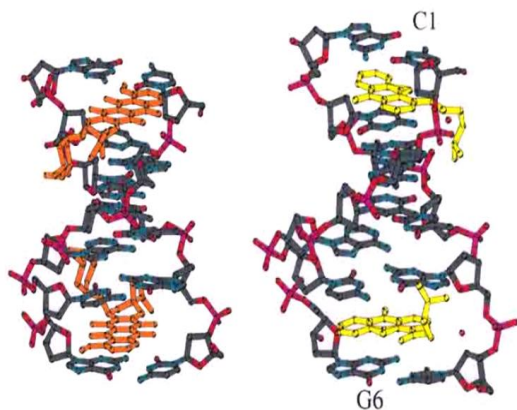


FIGURA 10. Estructura de Daunomicina (naranja) y 9 amino DACA (amarilla) intercaladas al ADN dentro de la secuencia (CGTACG) (43)

Estudios de mutación de la DTi II α han identificado muchos cambios en la secuencia de aminoácidos en la región codificante del gen que confiere resistencia a la m-AMSA, estos incluyen Ala642 por treonina o glicina (44), cambios en el aminoácido 824 (45), Gly437 por Ser, Arg450 por Gln y Pro 803 por Ser, ésta última mutación afecta la utilización de ATP (46).

Tras la amsacrina, un largo número de acridinas sintéticas y naturales han sido probadas como agentes anticancerígenos, pero hasta hoy, pocas moléculas han entrado a pruebas clínicas y han sido aprobadas para quimioterapia (47).

Por ejemplo, la asulacrina es un análogo cercano a la m-AMSA con amplio espectro de actividad en tumores experimentales, pero su actividad en la clínica es inferior. La DACA (XR5000) es una acridinacarboxamida que presenta inhibición mixta de DTi I y DTi II que ha sido objeto de ensayos clínicos extensos (Fig. 11). La pirazoloacridina KW-2170 es un inhibidor de DTi II de origen sintético que ha entrado a ensayos clínicos de fase II. Por otra parte la pirazoloacridina PD-115934 es un inhibidor dual de DTi I y II que también ha entrado a ensayos clínicos de fase II (27).

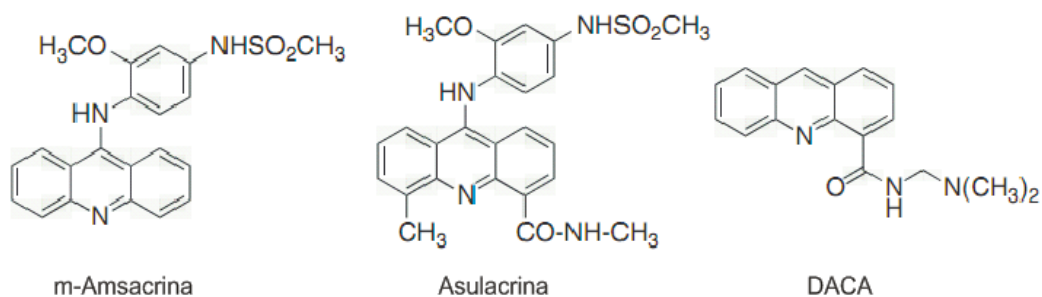


FIGURA 11 Estructura de algunos fármacos anticancerígenos derivados del núcleo de acridina (27).

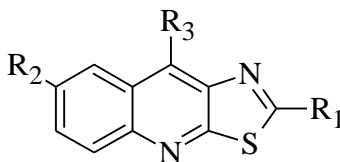
Las razones para el amplio uso de las acridinas como agentes activos quimioterapéuticos son variadas, pero incluyen su síntesis fácil, estabilidad biológica y la habilidad para unirse eficientemente al ADN y afectar su función en las células proliferantes (48).

La m-AMSA y otros venenos de DTi II pueden inducir muerte celular por apoptosis, aunque los detalles de este mecanismo no son claros. No obstante, el tratamiento con m-AMSA no altera la expresión de algunos genes involucrados en la vía apoptótica (bcl2, c-jun, p53), pero si eleva el nivel de ciclina E y disminuye el nivel de mRNA de c-myc en una forma dosis dependiente (49).

3.6.1 Tiazolo[5,4-b]quinolinas como bioisómeros de las acridinas.

Las tiazoloquinolinas son bioisómeros de las acridinas, que resultan de la sustitución anular de un anillo bencénico por un anillo de tiazol, siendo demostrada su actividad citotóxica por Álvarez-Ibarra y colaboradores. Los derivados reportados por este grupo de trabajo estaban sustituidos con grupos alquildiamino en las posiciones 2 y 9 (Tabla 1) (50).

TABLA 1. Actividad citotóxica de algunos derivados obtenidos por el grupo de Álvarez-Ibarra.



R1	R2	R3	CI ₅₀ (μM)		
			P-388	A-549	HT-29
SCH ₃	H	OH	>70.2	>70.2	>70.2
SCH ₃	CH ₃	OH	>66.9	>66.9	>66.9
SCH ₃	F	OH	>66.1	>66.1	>66.1
EDA	H	OH	5.7	7.2	7.2
EDA	CH ₃	OH	3.3	5.6	3.3
EDA	F	OH	1.6	2.9	5.0
SCH ₃	H	PDA	6.0	6.0	6.0
SCH ₃	CH ₃	PDA	5.4	5.4	5.4
SCH ₃	H	PDA2	12.1	12.1	12.1

EDA= NH(CH₂)₂N(CH₂CH₃)₂; PDA= NH(CH₂)₃N(CH₂CH₃)₂; PDA2= NH(CH₂)₃N(CH₃)₂

Posteriormente, en el grupo de trabajo de Lira Rocha se sintetizaron y se determinó la actividad citotóxica *in-vitro* y las propiedades de intercalación de nuevos derivados de tiazolo[5,4-

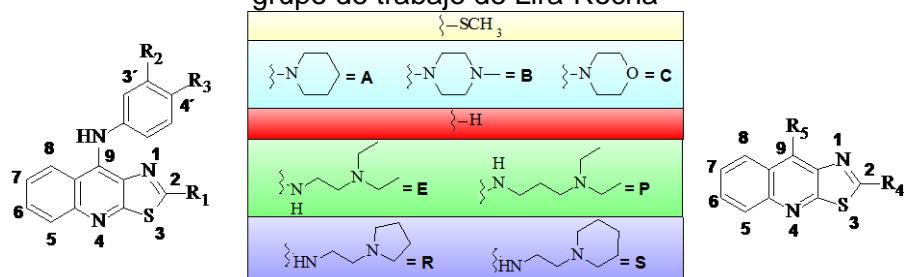
b]quinolina. Éstos también poseen grupos alquildiamino en la posición 2 y 9, así como grupos anilino en la posición 9 con sustituyentes en 3' y 4' (Tabla 2) (51, 52 y 53). En estos compuestos se observó que:

La presencia en la posición 2 de cadenas de N',N'-dietilaminoalquilamino y el aumento en la longitud de la cadena alifática de este grupo eleva la actividad citotóxica. Este incremento a su vez, provoca un aumento en el valor de Log P y quizá, esto provoque una mayor difusión hacia el interior de la célula. Esta suposición cuenta con el apoyo de que la actividad citotóxica de derivados de 9-anilino-2-aminoalquilaminotiazolo[5,4-b]quinolina que poseen un átomo de cloro en la posición 3' ó 4' del anillo de anilina, mejora en comparación con compuestos que carecen de este tipo de átomo.

La incorporación en la posición 9 de la cadena N',N'-dietilaminoetilamino mejoró la afinidad hacia al ADN.

Los derivados que poseen en la posición 2 grupos heterocíclicos saturados con restricciones conformacionales tienen poca o nula actividad citotóxica. El patrón de sustitución en el anillo de anilina en los derivados sin cadenas alquildiaminicas es crítico para la actividad citotóxica, aumentando de manera general con la presencia de grupos electroattractores respecto a los grupos electrodonadores, preferencialmente, en la posición 3'. La presencia de grupos aceptores de puentes de hidrogeno en la misma posición también favorece la actividad citotóxica.

TABLA 2. Actividad citotóxica de algunos derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina obtenidos por el grupo de trabajo de Lira-Rocha



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	CI ₅₀ (μM)			
				HeLa	SW480	SW620	K-562
1	SCH ₃	H	H	>80	>80	>80	>80
2	SCH ₃	Cl	H	69.37	>80	>80	80.26
3	SCH ₃	H	Cl	>80	>80	>80	79.45
4	SCH ₃	CN	H	7.75	28.68	43.75	8.01
5	SCH ₃	H	CN	>80	>80	>80	>80
6	SCH ₃	OCH ₃	H	25.34	66.65	26.58	22.17
7	SCH ₃	H	OCH ₃	>80	>80	>80	77.2
8	SCH ₃	(CO)E	H	21.69	13.6	19.72	12.54
9	SCH ₃	NMe	H	46.22	>80	>80	46.85
10	SCH ₃	CF ₃	H	43.34	65.13	62.28	67.06
11	H	OCH ₃	H	27.2	n.d.	76.6	23.6
12	H	CH ₃	H	85.8	n.d.	83.2	41.5
13	H	H	OCH ₃	30.8	n.d.	>80	41.8
14	H	CH ₃	H	>80	>80	>80	33.7
15	A	H	H	>80	>80	>80	>80
16	B	H	H	60.70	41.80	>80	73.01
17	C	H	H	>80	>80	>80	>80
18	E	H	H	15.96	37.7	21.6	16.8
19	E	Cl	H	9.12	14.33	17.78	12.19
20	E	H	Cl	10.16	12.56	12.20	7.26
21	E	CN	H	13.33	13.10	14.62	12.48
22	E	H	CN	15.18	14.18	16.49	8.36
23	E	OCH ₃	H	19.2	11.5	20.0	23.5
24	E	H	OCH ₃	13.60	12.04	16.38	10.87
25	P	H	H	6.27	6.90	16.56	7.52
26	P	Cl	H	7.46	7.91	10.17	9.84
27	P	H	Cl	8.82	4.92	7.48	3.36
28	P	CN	H	19.21	11.53	19.65	12.88
29	P	H	CN	24.81	22.70	29.15	12.88
30	R	H	H	27.81	29.1	31.58	24.11
31	R	Cl	H	14.64	15.42	14.37	5.69
32	R	H	Cl	17.46	26.51	13.47	19.48
33	S	H	H	32.28	26.7	20.13	21.25
34	S	Cl	H	12.06	12.75	18.12	10.62
35	S	H	Cl	14.42	18.42	11.6	7.38
	R ₄	R ₅		HeLa	SW480	SW620	K-562
36	E	Cl		12.86	19.48	15.22	9.28
37	SCH ₃	E		12.97	27.97	16.87	7.85
Amsacrina				9.50	27.70	16.70	19.90

3.6.2 D3CIP

Algunas de las tiazolo[5,4-b]quinolinas son citotóxicas en varias líneas celulares de cáncer, además de ser inhibidores de la topoisomerasa II humana *in vitro* (53). De acuerdo con estos estudios, la presencia de un sustituyente 2-[3-(dietilamino) etilamino] y un átomo de flúor en la posición 7 son determinantes para sus propiedades intercalantes. Las tiazolo[5,4-b]quinolinas que tienen un sustituyente 3-(dietilamina)propilamina en la posición 2, por lo general son más citotóxicas para varias líneas celulares de cáncer, a diferencia de los análogos que cuentan un sustituyente 3-(dietilamina)etilamina en la misma posición. El D3CIP (rojo en tabla 2) es una tiazolo[5,4-b]quinolina con alta capacidad citotóxica cuyo grupo sustituyente es la 3-(dietilamina)propilamina (Fig.12 B).

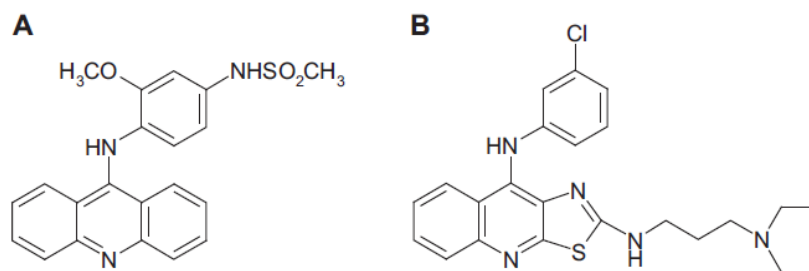


FIGURA12. Estructuras químicas A) m-AMSA y B) D3CLP

Este compuesto tiene actividad citotóxica contra varias líneas tumorales de cáncer, tales como líneas de cáncer cervical, colorrectal, mama y de leucemia (53).

Adicionalmente, se ha evaluado su actividad citotóxica relativa en células tumorales frente a células no tumorales. El D3CLP es cuatro veces más citotóxico en células tumorales que en células monocíticas de sangre periférica (PBMC). Por otra parte, induce muerte celular sin detener el ciclo celular, como se muestra por ensayos de citometría de flujo después de 12 h de exposición a este compuesto (53).

Los signos de apoptosis también son evidentes morfológicamente, según lo detectado por la obtención de células TUNEL positivas, por la condensación de la cromatina y por la posterior fragmentación nuclear. Todos los datos son consistentes con la inducción de muerte celular mediada por apoptosis en células K-562 a través de la activación de caspasas efectoras, como lo muestra el ensayo de Ac-DEVD-AMC, el cual, mediante la escisión proteolítica específica realizadas por caspasas, permite evaluar la actividad de éstas (53).

Adicionalmente, se ha evaluado la capacidad del D3CIP para formar complejos covalentes, como lo hace su análogo estructural, la m-AMSA. Mediante ensayos de aislamiento de

complejos covalentes, se determinó que el D3CIP no estabiliza los complejos en ensayos *in vivo* (5), a diferencia de la m-AMSA y el etopósido (VP-16), los cuales sí estabilizan los complejos covalentes en células K-562.

A pesar de que algunas tiazolo[5,4b]quinolinas fueron capaces de inhibir a la DTi II *in vitro*, resultaron incapaces de estabilizar los complejos covalentes enzima- ADN *in vivo*. Este hecho, no anula por completo la posibilidad de que el blanco de acción que les confiere citotoxicidad sea la DTi II, ya que existen otros intermediarios de la catálisis sobre los que los compuestos podrían ejercer la inhibición y que ocurren antes de la ruptura del ADN o después de la religación. Un análisis más detallado del mecanismo de inhibición podría aportar datos sobre este aspecto.

Estos resultados nos indican que posiblemente, los compuestos más citotóxicos podrían interactuar intracelularmente de una forma diferente. Determinar el efecto intracelular que producen los derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina más activos, mediante estudios de proteómica y/o análisis por microarreglos proveería información importante para proponer otros posibles modos de acción de estos fármacos (54).

3.7 Estrategias en el descubrimiento de blancos terapéuticos

Las técnicas aplicadas para la identificación y validación de blancos terapéuticos pueden ser divididas en dos grandes grupos:

Las estrategias moleculares y las sistémicas.

En la práctica ambas son usadas en proporciones variables dentro de las diversas áreas terapéuticas. Sin embargo, en años recientes ha habido un cambio significativo hacia la aproximación molecular en un intento de identificar nuevos blancos terapéuticos a través de entender los mecanismos celulares que enmarcan los fenotipos de la enfermedad. Esta aproximación se enfoca en las células implicadas en la enfermedad y usa muestras clínicas y modelos celulares.

En términos de clases de dianas moleculares, es más probable identificar blancos intracelulares, como lo son proteínas regulatorias, estructurales y metabólicas empleando el acercamiento a nivel molecular (55). El enfoque sistemático se orienta hacia el descubrimiento de dianas terapéuticas, a través del estudio en organismos enteros. En general, esta

información es derivada de estudios *in vivo*, en las áreas de fisiología, patología y epidemiología.

El descubrimiento de dianas terapéuticas está compuesto de tres pasos:

El planteamiento de modelos, la identificación del blanco y la validación del mismo.

La aproximación molecular, usa técnicas como la proteómica, genómica, asociación genética y genética reversa; mientras que la aproximación sistémica utiliza estudios clínico y estudios *in vivo* para identificar blancos potenciales.

La identificación y validación son los primeros pasos claves en el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos, que basan su desarrollo en tecnologías confiables para llevar a cabo estos objetivos. La proteómica ha sido ampliamente utilizada en los perfiles de expresión empleados para la validación.

Casi la mitad de las dianas moleculares caen dentro de seis familias:

- Receptores acoplados a proteínas G.
- Serin/Treonin y Tirosin cinasas.
- Metalopeptidasas.
- Proteasas de serina.
- Receptores nucleares hormonales.
- Fosfodiasterásas.

Estudios de proteómica comparativa en células de mamífero han arrojado resultados importantes en el empleo de nuevos blancos farmacológicos o en el reconocimiento de la participación de proteínas involucradas en tratamientos ya existentes (55)

3.7.1 Métodos Proteómicos.

Para determinar patrones de proteínas conocidas, los microarreglos son de gran efectividad. La ventaja más importante de este método es la habilidad para evaluar un gran número de muestras bajo las mismas condiciones, aunado a que se pueden utilizar muestras bloqueadas con parafina o congeladas, siendo muy útil para cuando se necesita almacenamiento de muestras. Dentro de esta área, modificaciones (como los microarreglos “forward and reverse”) hacen posible trabajar con lisados tisulares, fluidos y muestras de suero. Sin embargo, el

aspecto limitante de estas técnicas es que los análisis se limitan a proteínas con anticuerpos conocidos (56).

Los métodos que permiten definir y medir un rango más amplio de proteínas, son aquellos que están basados en espectrometría de masas (MS). Después de una separación química o física, un gran número de proteínas (por ejemplo aquellas que definen un tumor) pueden ser medidas. Las técnicas basadas en MS requieren un tratamiento sustancial antes del análisis. La cromatografía de afinidad y la electroforesis en dos dimensiones (2DE) son las más ampliamente utilizadas.

En el método tradicional de 2DE, las proteínas son separadas de la mezcla compleja de acuerdo a sus diferencias en la carga eléctrica y en su peso molecular. La ventaja de este método radica en que permite separar visualmente un gran número de proteínas. Esta técnica fue descrita en 1975 por O`Farrel (57), habiéndose creado la primer base de datos en 1981 (58). Los problemas de repetibilidad y de estandarización asociados al método fueron sobrellevados con el uso de los gradientes de pH inmovilizados (IPG) (59). El desarrollo de la técnica de electroforesis diferencial (DIGE), en el cual, las proteínas a separar son marcadas con marcadores fluorescentes incrementa el uso de este método, especialmente en investigación del cáncer. Sin embargo, se encuentran dificultades al tratar de visualizar proteínas en pequeñas cantidades, o aquellas muy pequeñas y/o de muy grandes dimensiones. A pesar de ello, este método es ampliamente usado ya que permite el uso de anticuerpos y la definición de proteínas desconocidas o con modificaciones asociadas (59)

En espectrometría de masas, el análisis de muestras proteicas es realizado por la determinación de la tasa masa/carga (m/z). Un espectrómetro de masas consiste de una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. En el estudio de las proteínas, dos técnicas de ionización son mayormente empleadas:

Matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI) para el análisis de estructuras peptídicas simples y ionización por *electrospray* (ESI) para muestras más complejas. Sin embargo, ya que permite la separación de muestras más complejas, el método SELDI (*Surface enhanced laser desorption ionisation*, un desarrollo de la técnica de MALDI) es el más usado en la proteómica del cáncer.

En MALDI, una proteína o un péptido son mezclados con una matriz en disolución. Pequeñas cantidades de la mezcla son depositadas en una superficie y se dejan secar. La muestra y la

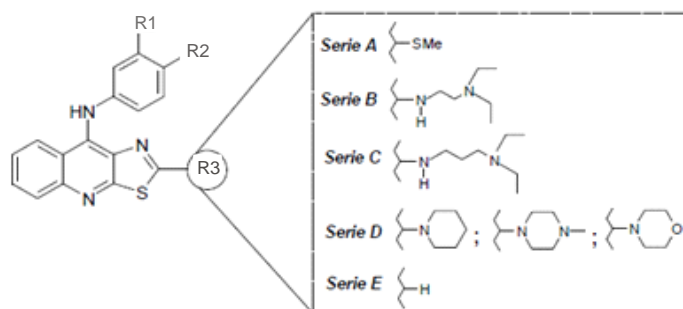
matriz cocrystalizan juntas mientras el disolvente se evapora. En SELDI, una pequeña cantidad de la mezcla proteica es agregada a una superficie modificada con una funcionalidad química en especial. Algunas de las proteínas se unen a la superficie, mientras que las restantes son removidas mediante un lavado. Después, se agrega la matriz y se permite que cristalice con los péptidos. La unión a la superficie de algunas proteínas, actúa como un paso de separación, siendo, las proteínas que se unieron más fáciles de analizar. Entre las superficies más comunes, se incluyen CM10 (intercambiador catiónico débil), H50 (superficie hidrofóbica), IMAC30 (unión a metales) y Q10 (intercambiador aniónico fuerte). Las superficies pueden ser funcionalizadas también con anticuerpos, otras proteínas e incluso ADN (60).

Los analizadores de masas más usados en estudios de proteómica son: trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF), cuadrupolo y transformada de Fourier ciclotrón de iones (FT-MS). Para el análisis del espectro de masas, se necesitan herramientas bioinformáticas y estadísticas. Entre las herramientas disponibles comercialmente se encuentran Proteome, Quest, Propek, Bamf, y Biomarker Wizard (61,62).

4. Planteamiento del problema.

En el grupo de trabajo del Dr. Lira se sintetizaron una serie de compuestos isómeros de la m-AMSA, a los cuales se les evaluó la actividad citotóxica en tres líneas celulares (HeLa, SW-620 y K-562) empleando el ensayo de reducción de MTT. Los resultados están resumidos en la tabla 3:

TABLA 3. Comparación de actividad citotóxica (CI 50 μ M) en líneas celulares de derivados de 9-anilino-5,4-b) quinolina (1,4,6). En rojo el D3CIP, fármaco empleado para realizar los ensayos.



Serie	Compuesto	R1	R2	R3	CI ₅₀		
					HeLa	SW 620	K-562
A	1	H	H	SCH3	SA	SA	SA
A	2	3'-Cl	H	SCH3	69.37	129.73	80.26
A	3	3'-CN	H	SCH3	7.75	43.75	8.01
A	4	3'-OMe	H	SCH3	25.34	26.58	22.17
A	5	H	4'-Cl	SCH3	123.86	145.95	79.45
A	6	H	4'-CN	SCH3	140.02	SA	120.01
A	7	H	4'-OMe	SCH3	SA	110.80	77.20
B	8	H	H	E	15.96	21.60	16.80
B	9	3'-Cl	H	E	9.12	17.78	12.19
B	10	3'-CN	H	E	13.33	14.62	12.48
B	11	3'-OMe	H	E	19.20	20	23.50
B	12	H	4'-Cl	E	10.16	12.20	7.26
B	13	H	4'-CN	E	15.18	16.49	8.36
B	14	H	4'-OMe	E	13.60	16.38	10.87
C	15	H	H	P	6.27	16.56	7.52
C	16	3'-Cl	H	P	7.46	10.17	9.84
C	17	3'-CN	H	P	19.21	19.65	12.88
C	18	H	4'-Cl	P	8.82	7.48	3.36
C	19	H	4'-CN	P	24.18	29.15	12.88
D	20	H	H	X	≥80	≥80	≥80
D	21	H	H	Y	60.70	≥80	73.01
D	22	H	H	Z	≥80	≥80	≥80
E	23	H	H	H	SA	SA	SA
E	24	3'-Cl	H	H	SA	SA	SA
E	25	3'-CN	H	H	SA	SA	SA
E	26	3'-OMe	H	H	27.20	76.60	23.60
E	27	3'-Me	H	H	85.80	83.20	41.50
E	28	H	4'-Cl	H	SA	SA	SA
E	29	H	4'-CN	H	SA	SA	SA
E	30	H	4'-OMe	H	30.80	SA	41.80
E	31	H	4'-Me	H	SA	SA	33.70
Amsacrina *					9.50	27.70	19.90

*Compuesto de referencia. SA, Sin actividad a las concentraciones de (0.1, 1, 15, 45 y 90 μ M)

E= NH-(CH₂)₂-N(Et)₂

P= NH-(CH₂)₃-N(Et)₂

X= 1-piperidinil

Y= 1-(4-metil)piperazinil

Z= 1-morfolinil

Como se puede observar, los derivados del núcleo de acridina presentan diversos efectos al ser aplicados a diferentes líneas celulares. Los cambios en los patrones y en el tipo de sustituyentes de los compuestos afectan la actividad citotóxica en las líneas celulares de manera heterogénea. Por ser isómeros de la amsacrina, se podría suponer que la actividad citotóxica de los derivados empleados proviene de su capacidad para intercalarse en el ADN e inhibir a la DTi II, sin embargo, no se observa la formación de los complejos covalentes *in vivo* (5), por lo que esta diferencia indicaría que el mecanismo de acción es diferente. En este trabajo se planea explorar el mecanismo de acción por el cual las tiazolo[5,4-b]quinolinas ejercen su actividad citotóxica, por medio de un análisis de los cambios en el proteoma de células HeLa (empleando geles en 2 dimensiones) por efecto del tratamiento con D3CIP.

5.- Hipótesis

Los derivados citotóxicos de las tiazolo[5,4b]quinolinas provocarán cambios en el perfil proteómico de células HeLa, que reflejarán el blanco terapéutico por el cual ejercen su efecto citotóxico estos fármacos.

6. Objetivos

General:

Usando células HeLa, identificar conjuntos de proteínas relacionadas con una o más funciones celulares, cuyo contenido se vea afectado por el tratamiento con tiazolo[5,4b]quinolinas citotóxicas, para proponer un posible mecanismo de acción citotóxica de estos compuestos.

Particulares:

- Comparar los perfiles proteicos de células HeLa control (vehículo), con las tratadas con tiazolo[5,4b]quinolinas y m-AMSA , a tiempos cortos de exposición (12 y 18 h) y detectar proteínas que presenten cambios importantes en su contenido, ya sea que disminuyan o aumenten como resultado del tratamiento.
- Identificar mediante técnicas de espectrometría de masas la posible identidad de las proteínas que presentaron incrementos como resultado del tratamiento.
- Identificar mediante técnicas de espectrometría de masas la posible identidad de las proteínas que presentaron reducción como resultado del tratamiento.
- Asociar las proteínas identificadas con las funciones celulares en las que participan.
- Proponer mecanismos de citotoxicidad de las tiazolo[5,4b]quinolinas.

7. Materiales y Métodos.

7.1 Aislamiento de complejos ADN-topoisomerasa *in vivo*. Ensayo ICE.

Bajo condiciones fisiológicas normales, la vida media de los complejos covalentes topoisomerasa-ADN es muy corta, dado que el paso de religación está ampliamente favorecido. Esta rápida religación debe contribuir a resguardar la integridad del material genético. Muchas clases de fármacos antineoplásicos y antibacteriales han mostrado actividad citotóxica a través de modificar el equilibrio de ruptura/religación del ADN aumentando la vida media de los complejos de ruptura (Fig.13; 63).

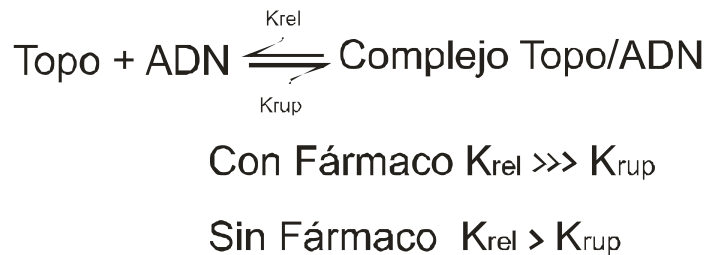


FIGURA 13. En ausencia de inhibidores enzimáticos, el equilibrio de ruptura/ligación de las topoisomerasas favorece la religación rápida de ADN roto o escindido (63).

Por tanto, el tratamiento con estos fármacos incrementa la vida media de los complejos covalentes, induciendo daño al ADN, mecanismo por el que se postula que estos fármacos actúan en la clínica (3). El Ensayo ICE mide la estabilización de complejos de ruptura entre el ADN genómico y las topoisomerasas inducido por fármacos como la camptotecina y la m-AMSA *in vivo*. El método implica la separación física de los complejos ADN/enzima de la proteína libre, seguido de la utilización de anticuerpos para detectar DTi unida al ADN, permitiendo de esta forma la cuantificación de los complejos covalentes. La captación, localización, actividad y la eficacia puede ser mejor evaluada por este método que por los ensayos *in vitro*, siempre que el mecanismo de citotoxicidad del fármaco esté mediado por la formación de este tipo de complejos. Para llevar a cabo este ensayo, las células son expuestas a los fármacos bajo condiciones en las que la enzima endógena se encuentre llevando su ciclo de reacción, seguido de la adición de sarkosyl para una lisis celular rápida y efectiva (pero sin la fragmentación mecánica del ADN). Bajo estas condiciones las proteínas son desnaturalizadas y las interacciones electrostáticas entre las proteínas y el ADN se debilitan. Posteriormente, los lisados son cargados en un gradiente de cloruro de cesio y centrifugados para disociar interacciones no covalentes entre las proteínas y el ADN. Esta centrifugación además permite separar las proteínas libres y el ADN acomplejado con proteínas. Después de fraccionar el gradiente se realizan inmunoblots usando anticuerpos apropiados que permitan definir la

presencia de topoisomerasas en la región de ADN, midiendo de esta forma la formación de complejos covalentes estabilizados por la acción de los compuestos.

Materiales

Compuestos a evaluar

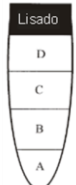
- DMSO - Control Negativo
- m-AMSA - Control Positivo DTi II
- Camptotecina - Control Positivo DTi I
- D3CIP – Isómero putativo de m-AMSA a evaluar.

Preparación de los lisados.

Se cultivaron células HeLa (células epiteliales humanas procedentes de un adenocarcinoma cervical, en cajas Petri (una por tratamiento) de 100 mm hasta que alcanzaron un 90% de confluencia (Aproximadamente 1×10^7 células) en medio Eagle modificado de Dulbecco + 10 % de suero fetal bovino. El medio se removió de las células y se reemplazó por medio libre de suero (1 mL) en donde los compuestos se añadieron a una concentración final de 100 μ M. Igualmente, se incubaron un control positivo con Camptotecina (Topogen) y otro con m-AMSA (Topogen) con capacidad conocida en la formación de complejos de ruptura. Adicionalmente, se incubó un control negativo con DMSO (Merck). Las células se incubaron a 37°C, durante una hora. Posteriormente, se eliminó el medio y las células se lisaron agregando sarkosyl al 1% equilibrado a 37°C (1mL por tratamiento).

Gradiente de densidad en cloruro de cesio.

A partir de la solución stock de cloruro de cesio (Topogen®) se prepararon cuatro diferentes diluciones de acuerdo al siguiente cuadro.



Capa	A	B	C	D
TE	0.075	0.2	0.45	0.55
CsCl	0.925	0.8	0.55	0.45
Densidad	1.82	1.72	1.5	1.3

Fig. 14

Las soluciones de concentraciones variables de CsCl se dispusieron en forma decreciente de densidad. Se agregó 1 mL de las soluciones A, B, C y D en tubos de polialómero de 13 X 51 mm (Beckman Instruments), como se presenta en la figura 14. Se agregó el lisado en la parte

superior del gradiente (1 mL). Los tubos se centrifugaron a 125 000 g (Rotor SW55 Ti, ultracentrífuga L7-65 Beckman Instruments) durante 24 horas, a 20°C.

Se localizaron las fracciones de ADN midiendo la absorbencia a 260 nm, previo a una dilución de 30 µL de fracción en 270 µL de agua destilada. El ADN en cada fracción se estimó mediante el método de Warburg-Christian empleando datos espectrofotométricos a 260 y 280 nm (Optizen POP Bio).

Electrotransferencia e inmunodetección (Western blot)

Se cortaron membranas de nitrocelulosa (Biorad) y se remojaron en PBS 25 mM pH 6.5 por 15 minutos. Se diluyeron las alícuotas de cada fracción (50-100 µL) con un volumen igual de PBS 25 µM pH 6.5 y se aplicaron las muestras al dispositivo dot-blott (Bio-dot, Biorad) usando vacío. Posteriormente, se removió la membrana y se enjuagó brevemente con PBS 25 mM.

La membrana fue equilibrada en TBST 1X conteniendo 5% de leche en polvo sin grasa (BLOTTO) a temperatura ambiente, durante 12 horas con agitación, seguido por tres lavados con TBST 1X (10 minutos por lavado). Se incubó la membrana con el anticuerpo primario (DTi I o DTi II; Topogen, histona γH2Ax phospho S139 Abcam), durante 6 horas a temperatura ambiente.

Después de 3 lavados de diez minutos con TBST 1X (10 minutos por lavado), se incubó la membrana con anticuerpos anti-conejo (1:40,000) marcados con peroxidasa de rábano (Millipore) durante una hora. Posterior al lavado del anticuerpo secundario, se reveló la reacción por quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate; Thermo Scientific). Las películas (KODAK) se capturaron en formato digital con el transiluminador *Image Station* 4000MM (KODAK) y se analizaron con el software Carestream de KODAK.

7.2 Geles de retardo

Se evaluó la intercalación al ADN mediante el retardamiento en la migración de ADN plasmídico. Si el fármaco empleado se intercala entre las bases del ADN, éste modificará la migración del plásmido en el gel debido a un cambio en el superenrollamiento del ADN. Se incubó durante 1 hora 10 ng de plásmido pHOT-1 (Topogen®) en su forma superenrollada o relajada con los fármacos D3CIP, m-AMSA y cisplatino a distintas concentraciones (10, 25, 50, 100 μM). Se utilizó DMSO como control negativo y bromuro de etidio (EtBr) como control positivo de intercalación. Posteriormente, se corrieron las muestras de ADN en un gel de agarosa al 1.75% a 25 Volts y finalmente se tiñó el gel con EtBr.

7.3 Ensayos de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. La producción de formazán a partir de MTT, produce un compuesto de color que es cuantificable a 540 nm, permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir viabilidad y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (64).

En placas de 96 pozos, se cultivaron un promedio de 7×10^3 células por pozo, a las cuales fueron añadidos el D3CIP y la m-AMSA a 4.2, 8.3, 25 y 41.7 μM en un volumen final de 200 μL de medio DMEM sin suero fetal bovino. La viabilidad celular se determinó a las 6, 12 y 18 horas. Al cumplirse estos tiempos, se añadieron 20 μL de la disolución de MTT 2.5mg/mL (SIGMA) y se incubó durante 90 minutos. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 200 μL de DMSO para disolver el formazán. Finalmente, se determinó la absorbencia a 540nm (Epoch-Biotek) y se determinó el % de inhibición empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición del crecimiento celular (\%)} = \left(1 - \left(\frac{\text{absorbencia de células tratadas}}{\text{absorbencia de células no tratadas}}\right)\right) * 100$$

7.4 Geles en dos dimensiones

La electroforesis bidimensional es una técnica que se emplea para la separación diferencial de proteínas en función de su punto isoeléctrico y su peso molecular. Las movilidades electroforéticas de las proteínas reflejan modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones, ya que estas modificaciones afectan el punto isoeléctrico y el peso molecular de las proteínas. Dadas estas características los geles en dos dimensiones, pueden detectar

alteraciones asociadas a enfermedades, tales como el cáncer. El tamaño (intensidad y área) de las manchas, pueden cambiar en función del nivel de expresión de las proteínas, permitiendo de esta forma la comparación entre múltiples muestras o tratamientos.

Cultivo celular y exposición a fármacos.

Se cuantificaron 1.5 millones de células HeLa y se permitió el crecimiento durante 24 horas en medio DMEM con SFB para obtener un aproximado de 3 millones al día siguiente. Transcurridas las 24 horas, el medio se removió de las células y se reemplazó por medio DMEM libre de suero (6 mL) en el cual se añadieron el D3CIP y la m-AMSA a 25 μ M.

Las células se incubaron a 37 °C, durante 12 o 18 horas, se removió el medio y se realizaron 3 lavados con PBS; posteriormente se removieron las células de la caja Petri mediante un raspado leve y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugaron a 1200G durante 5 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se lavaron las células añadiendo 1 mL de PBS frío al tubo de centrifuga y se resuspendió el precipitado. Se centrifugaron las células nuevamente a 1000 G por 3 minutos, a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se repitió el proceso de lavado tres veces más. Después del último lavado, se desechó todo el PBS procurando recuperar la totalidad del precipitado celular.

Lisis celular.

A cada tubo se añadieron 300 μ l de buffer de extracción (TRIS 30mM, urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 10 mM, IPG Buffer 0.5%, EDTA 1mM, pH 8.5, inhibidores de proteasas Complete (Roche)), y se resuspendió el precipitado de células empleando el vortex durante 10 a 30 segundos. Posteriormente, se homogenizó por sonicación 3 veces durante 20 segundos en baño de hielo. El lisado celular se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min a 4°C. Se recolectó el sobrenadante (aprox. 300 μ L) evitando desprender el botón viscoso (ADN-ARN). Se cuantificó la proteína por el Método Bradford (Biorad).

Primera dimensión

Se rehidrataron pasivamente tiras IPG de 17 cm con un rango de pH 3-10 (Readystrip Biorad) con 750 μ g de proteína. Se agregó una capa de fluido de recubrimiento (Biorad) para evitar la evaporación y se permitió la hidratación de la tira durante 18 horas. Después del proceso de hidratación, se colocó la tira en el dispositivo Protean IEF (Biorad) y se programó la corrida de acuerdo a la tabla 4:

TABLA 4. Condiciones de corrida del isoelectroenfoque para tiras de 17cm.

Paso S (Step-Hold) Grad (Gradient)	Voltaje	Volt:horas (kVh)
1 SH	500	500
2 Grad	1000	800
3 Grad	10,000	16,500
4 SH	10,000	27,200

Una vez terminado el proceso de isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron con amortiguador de equilibrio (Urea 6M, Tris-HCl 75mM pH 8.8, Glicerol 29.3%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%) al cual se le agregó DTT (10 mg/mL), y se agitó durante 15 minutos. Posteriormente, se enjuagó la tira con buffer de corrida y se equilibró con Iodoacetamida (25 mg/mL) durante quince minutos más.

Segunda Dimensión

Se elaboró un gel de poliacrilamida al 14% al que se le colocó en la parte superior la tira IPG previamente equilibrada.

Posteriormente, se selló el dispositivo con solución selladora de agarosa al 1%, y se permitió la solidificación durante 15 minutos.

Se corrió la electroforesis a 170 V y, posteriormente se tiñó con azul de Coomassie.

Se analizaron los geles empleando el software *SameSpot* (Progenesis®).

Espectrometría de masas con desorción asistida por laser

El análisis de las manchas de proteína se realizó mediante espectrometría de masas con desorción asistida por láser (MALDI-MS).

Las manchas de proteínas se escindieron del gel y se destiñeron con una solución de acetonitrilo (Sigma) al 50% y bicarbonato de amonio 50 mM que fueron concentradas en un evaporador (Eppendorf 5301). Cada uno de los fragmentos se rehidrató con 15 μ L de bicarbonato de amonio (Merck) 1 mM conteniendo 50 ng/ μ L de tripsina (Roche diagnostics).

Después de 16 horas de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 20µL de acetonitrilo al 50%, conteniendo 0.3% de ácido trifluoroacético (Sigma) y se incubaron por 15 minutos con agitación constante.

La mezcla de péptidos (1.5 µL) fue aplicada simultáneamente a 1 µL de solución de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico con los péptidos estándar des-Arg-bradiginina (Sigma, Mr 904.4681) y los fragmentos 18-39 de la hormona adrenocorticotropica (Sigma, Mr 2465.1989) en 65% de etanol, 35% de acetonitrilo y 0.03% de ácido trifluoroacético. Posteriormente, las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas (4800 Plus, MALDI TOF/TOF Analyzer).

La identificación de los cambios en la expresión de las proteínas y la búsqueda de identidad de las mismas, se realizó mediante la comparación de los patrones obtenidos con dos bases de datos de proteínas humanas: MASCOT y PILOT.

8. Resultados

8.1 Ensayos de intercalación al ADN

Para detectar la intercalación de los fármacos, se emplearon geles de retardo en la migración de ADN plasmídico. Se utilizó el plásmido superenrollado pHOT (topogen), el cual se incubó durante 1 hora con diversos compuestos de conocida interacción con el ADN. El tratamiento con cisplatino generó especies con migración diversa, lo cual, es resultado de la conocida formación de aductos entre las cadenas de ADN que produce éste compuesto. El EtBr y la m-AMSA retrasaron la movilidad del plásmido de una forma concentración dependiente. El retardamiento se debe a un proceso de intercalación bien definido para ambos compuestos (28, 29). A diferencia de las moléculas anteriores, con éste ensayo, no se observaron cambios en la movilidad del plásmido empleando D3CIP (Fig. 15).

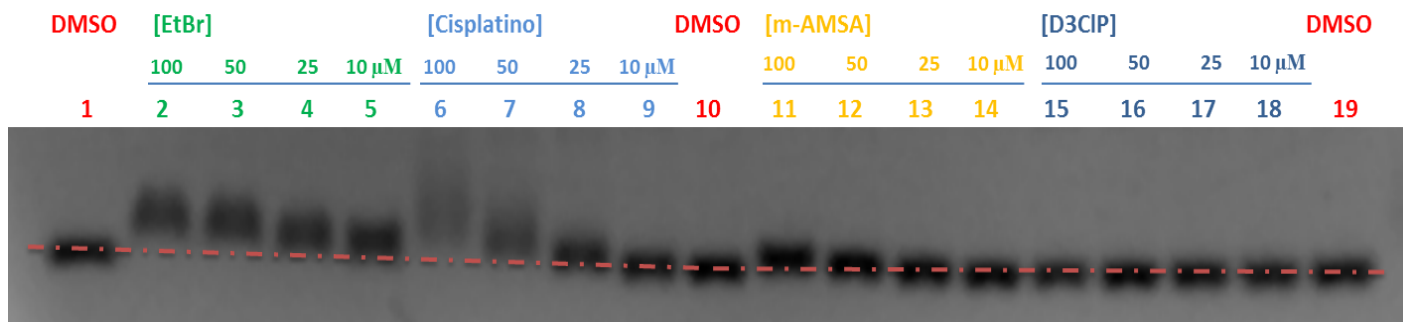


FIGURA 15. Gel de retardo. Se incubaron 10 ng de plásmido superenrollado pHOT-1 a concentraciones decrecientes de los compuestos (100, 50, 25, 10 micromolar) durante 1 hora. Posteriormente, se corrieron las muestras de ADN en un gel de agarosa al 1.75% a 25 Volts. 1 DMSO, 2-5 EtBr, 6-9 Cisplatino, 10 DMSO, 11-14 m-AMSA, 15-18 D3CIP, 19 DMSO.

Posteriormente, se evaluaron otros compuestos derivados de tiazoloquinolinas (Tabla 2) con el fin de descartar que el comportamiento antes detectado fuera exclusivo de los sustituyentes con los que cuenta el D3CIP.

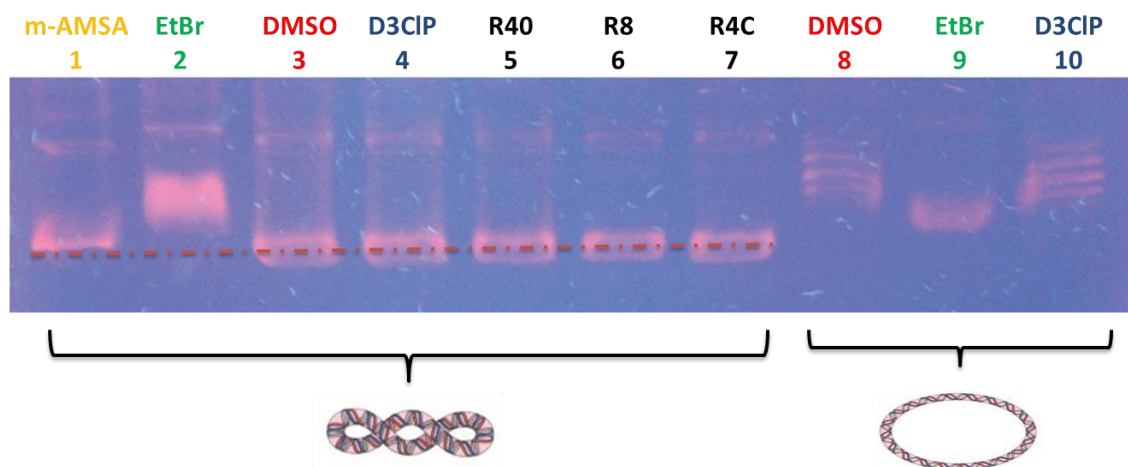


FIGURA 16. Gel de retardo. Se incubaron durante 1 hora 10 ng de plásmido superenrollado pHOT-1 a 100 μ M de los compuestos: 1 m-AMSA, 2 EtBr, 3 DMSO, 4 D3CIP, 5 R40.6 R8 y 7 R4C. En los carriles 8,9 y 10 se incubó el plásmido pHOT-1 en su forma relajada durante 1 hora a 100 μ M de los compuestos: 8 DMSO, 9 EtBr, 10 D3CIP.

Al igual que el D3CIP, los otros derivados no produjeron un retardamiento en la migración del ADN. Al emplear un plásmido superenrollado, los sitios de intercalación se reducen de una manera considerable, por lo que sólo los intercalantes más efectivos logran afectar la topología del plásmido. Para descartar que la topología del plásmido superenrollado no permitiera una intercalación fácil, se empleó el mismo plásmido en su forma relajada. Al utilizar el EtBr como agente intercalante, la topología del plásmido cambia de su forma relajada a su forma superenrollada, provocando que aumente la migración del plásmido. Nuevamente, al incubar el plásmido con el D3CIP, éste no modifica los isómeros (Fig. 16).

8.2 Ensayo ICE

Para evaluar si las tiazolo[5,4b]quinolinas actúan estabilizando el complejo ADN-Topoisomerasa en células HeLa, se empleó el ensayo ICE, el cual permite determinar la formación de los complejos de ruptura *in vivo*, a partir de la centrifugación diferencial del ADN y las proteínas. Al analizar la zona del gradiente donde se separa el ADN, sólo se encontrarán proteínas en esta región si se encuentran unidas covalentemente al ADN (63). La estabilización del complejo de ruptura evita el proceso de religación, lo que supondría localizar a la enzima unida al ADN por medio de un enlace fosfotirosilo.

El uso de agentes que ayudan a estabilizar estos complejos permite identificar topoisomerasas unidas al ADN, como se puede ver en los tratamientos con m-AMSA y camptotecina. Ambos compuestos forman complejos covalentes detectables, a diferencia de los controles negativos, tratados con DMSO (Fig. 17).

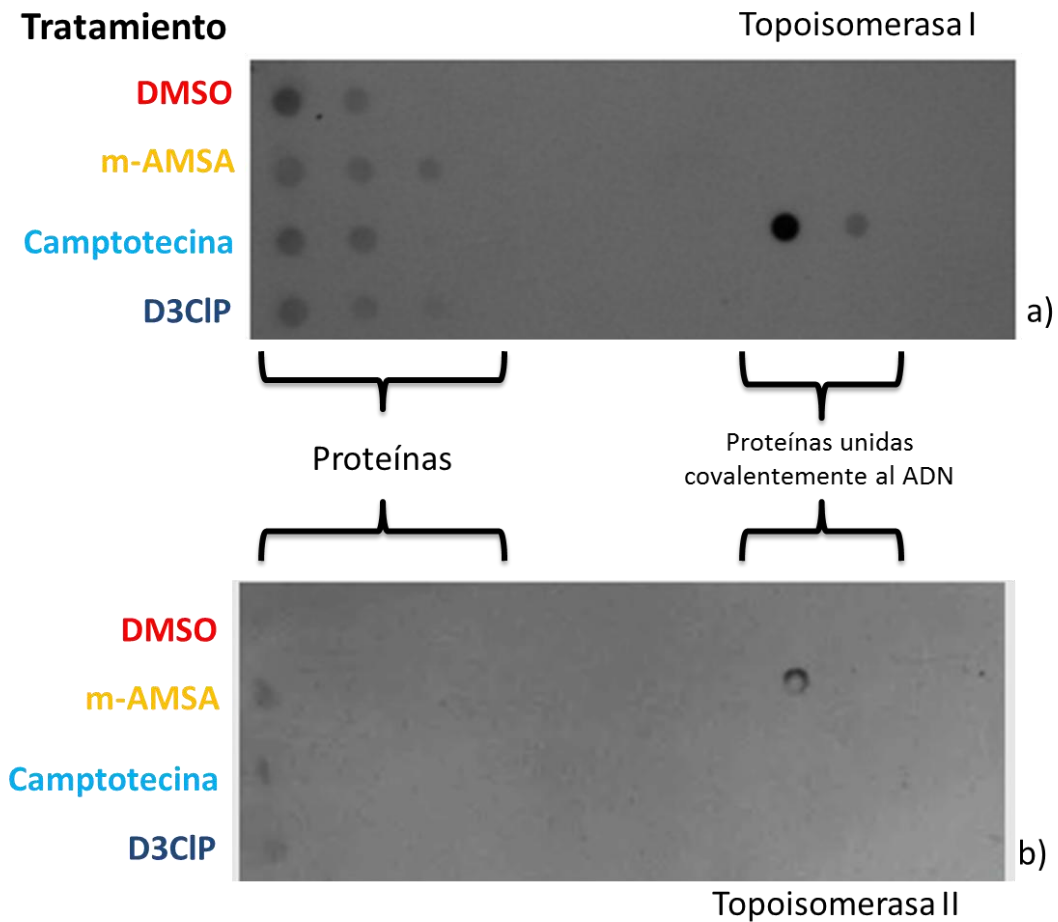


FIGURA 17. Análisis de inmunoblot de complejos Topoisomerasa I- ADN a) y Topoisomerasa II- ADN b) estabilizados por fármacos en células HeLa. a) Las fracciones iniciales corresponden a la fracción soluble de proteína, por lo que se espera la presencia de topoisomerasa I libre. El complejo covalente Topoisomerasa I- ADN puede ser detectado en las fracciones finales del tratamiento con Camptotecina. b) Se detectó la formación de complejos covalentes Topoisomerasa II - ADN en el tratamiento con m-AMSA en las fracciones finales, a diferencia de los demás tratamientos. En ambos experimentos las células tratadas con vehículo (DMSO) se consideran como control negativo.

Con este ensayo podemos descartar que la actividad citotóxica presente en los ensayos de MTT se encuentre relacionado directamente con la formación de los complejos covalentes en células HeLa, a diferencia de la actividad antitumoral mediada por m-AMSA y camptotecina, los cuales sí presentaron actividad estabilizadora de los complejos de ruptura.

Pese al bioisosterismo con la m-AMSA, la acción citotóxica de las tiazolo[5,4b]quinolinas presenta importantes diferencias respecto a la m-AMSA, ya que en ensayos *in vivo*, los derivados de tiazoloquinolinas no estabilizan los complejos covalentes, en tanto que la m-AMSA sí lo hace.

8.3 Tratamientos

DMSO

D3CIP

m-AMSA

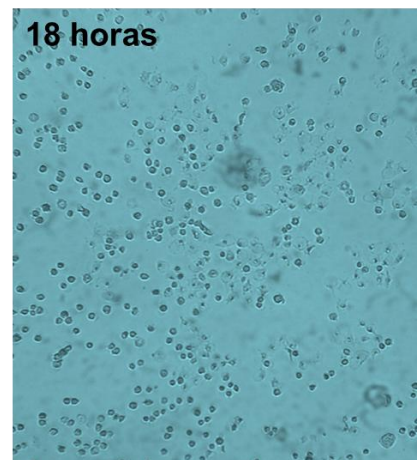
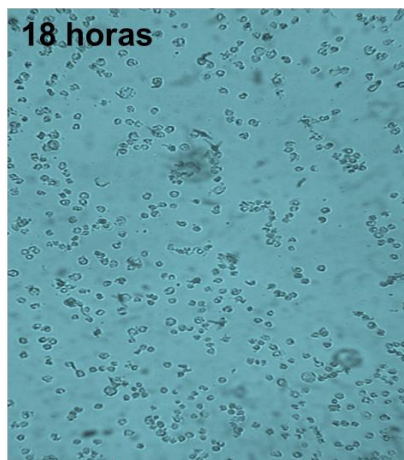
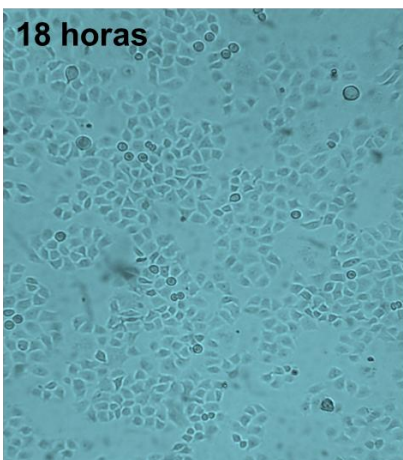
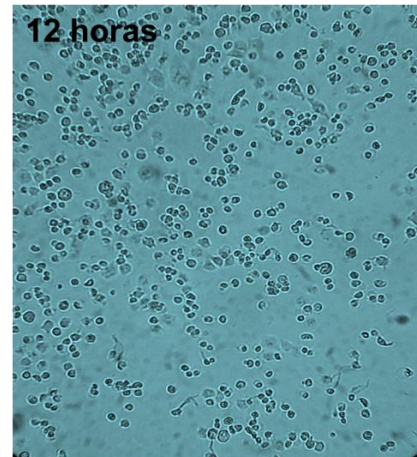
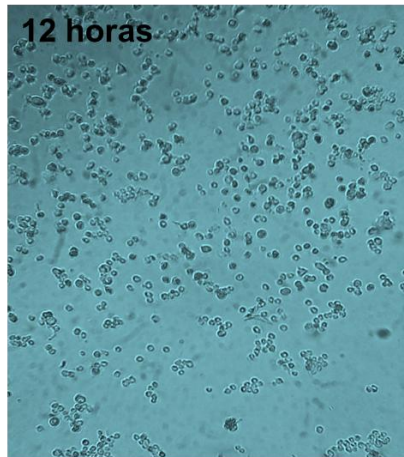
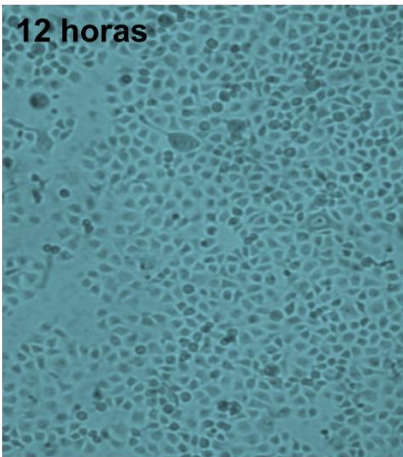
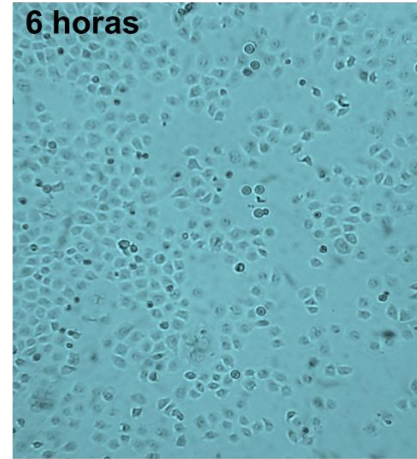
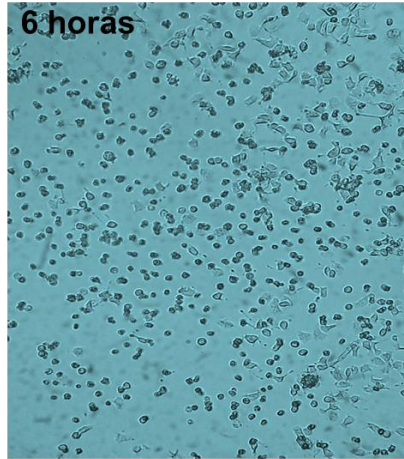
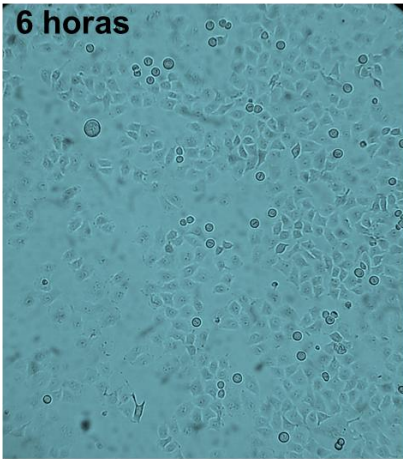
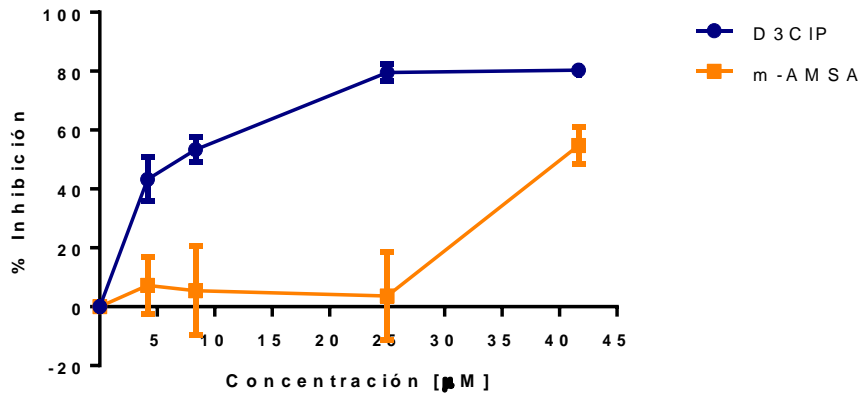
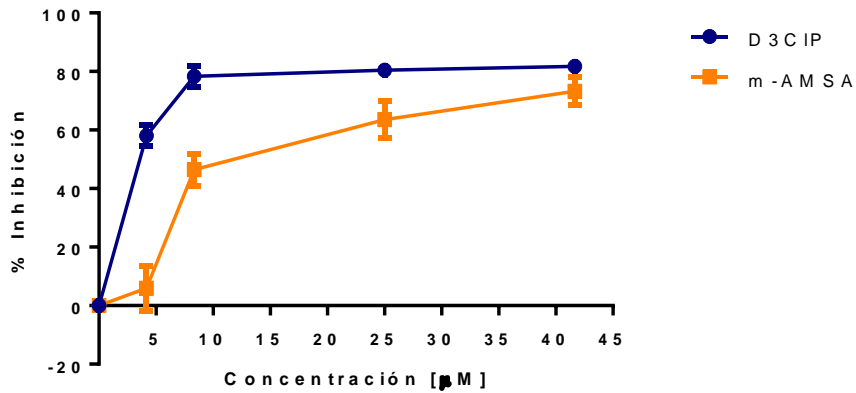


FIGURA 18. Efecto de los tratamientos en 7×10^3 células HeLa, en un lapso de 6, 12 y 18 horas de incubación con los tratamientos a $25 \mu\text{M}$ de m-AMSA y D3CIP. Imágenes tomadas a 20X.

% Inhibición de crecimiento a 6 horas de tratamiento



% Inhibición de crecimiento a 12 horas de tratamiento



% Inhibición de crecimiento a 18 horas de tratamiento

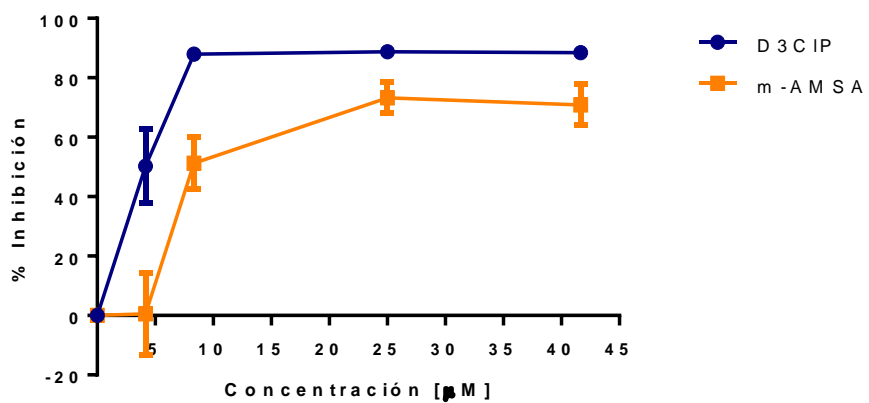


FIGURA 19. % Inhibición de células HeLa por efecto del tratamiento con D3CIP o m-AMSA a 4.2, 8.3, 25 y 41.7 μM a 6, 12 y 18 horas de incubación.

Para determinar la viabilidad celular se realizaron ensayos de MTT, el cual es un ensayo enzimático que nos permite determinar integridad mitocondrial. A tiempos cortos (6 horas), el tratamiento de 25 μ M de D3CIP ya produjo muerte celular en la mayoría de las células (Fig 18 y 19), presumiblemente por apoptosis (6,53). No así, el tratamiento con m-AMSA, en el cual, se observa un gran porcentaje de células viables a las seis horas, comenzando a disminuir la viabilidad a las 12 horas del tratamiento (Fig 18 y 19). Se utilizaron los tiempos de 12 y 18 horas a una concentración de 25 μ M para realizar los ensayos en 2D, ya que a estos tiempos y a esta concentración se observa la mayor inhibición del crecimiento celular.

8.4 Fosforilación de γ H2AX

Cuando la integridad del material genético se afecta, una de las respuestas a la ruptura de la doble cadena de ADN se encuentra en la fosforilación en la serina 139 de la variante de histona H2AX (65). Se utilizó esta señal para determinar si el tratamiento con D3CIP producía una respuesta de reparación en el ADN, presumiblemente inducida por daños al material genético. En ensayos a 6 y 12 horas, la fosforilación en el residuo 139 se presenta en los tratamientos con m-AMSA y D3CIP, pero no en el tratamiento con el vehículo, lo que posiblemente indique una respuesta por daño a la doble hebra (Fig.20).

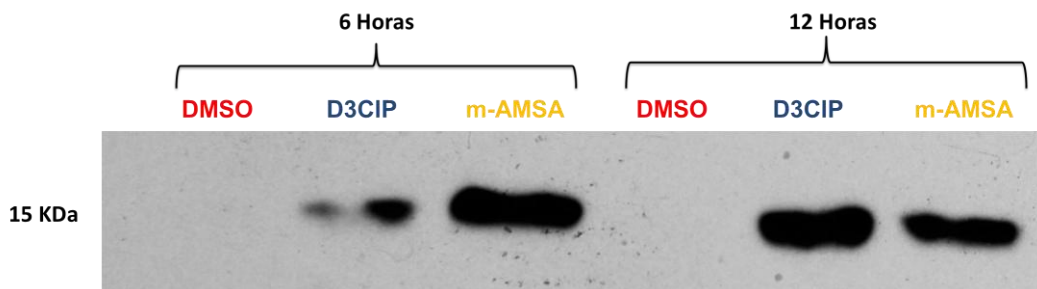
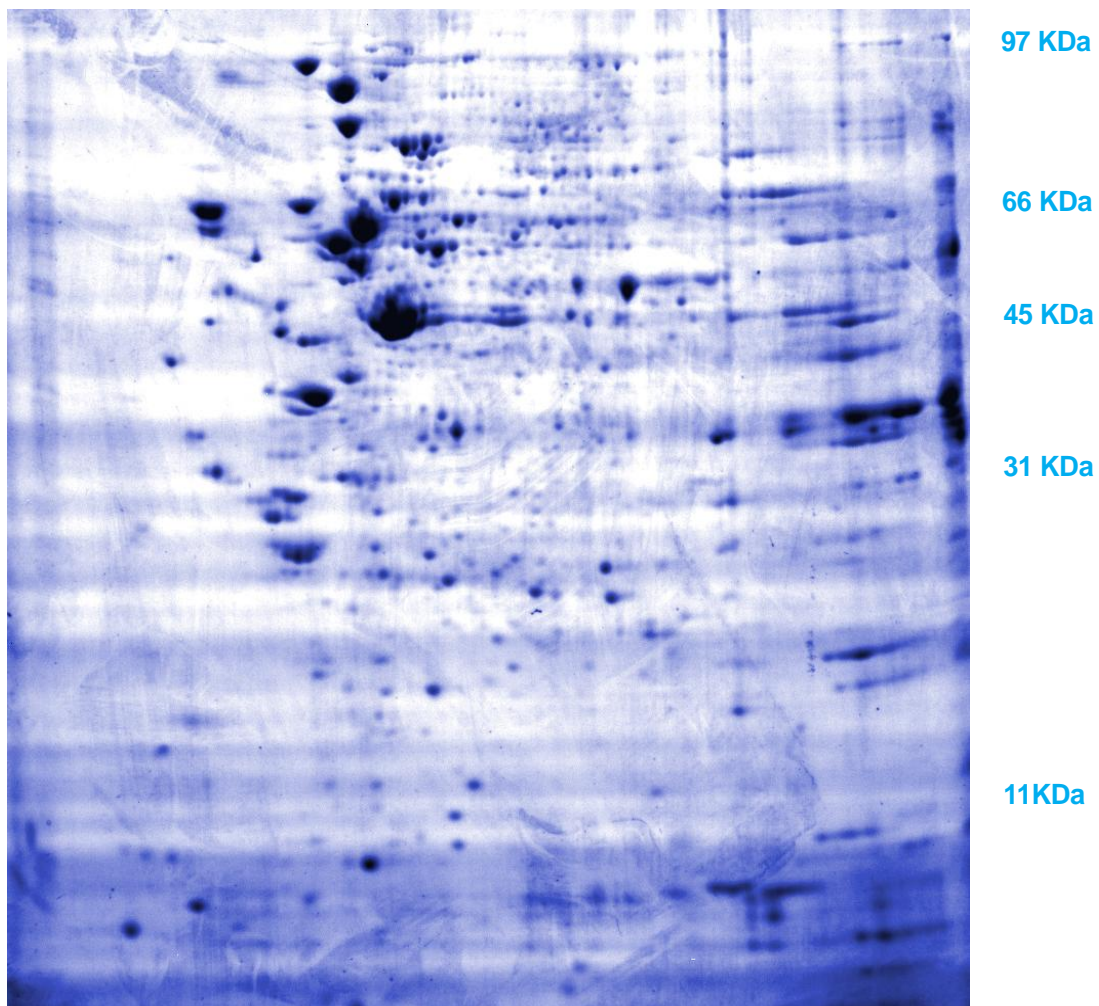


FIGURA 20. Fosforilación de la histona γ H2AX por el tratamiento con D3CIP 25 μ M, m-AMSA 25 μ M (control positivo) y DMSO (vehículo-control negativo) a 6 y 12 horas de incubación.

8.5 Electroforesis en dos dimensiones

Para determinar los cambios asociados por el tratamiento con D3CIP, se implementó una estrategia proteómica. Se realizaron geles en 2D en los que se detectaron cambios debido a la incubación a 12 y 18 horas con DMSO, D3CIP y m-AMSA a 25 μ M (Fig. 21)



a)

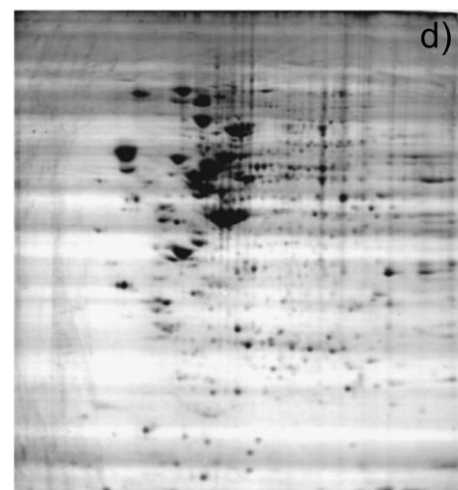
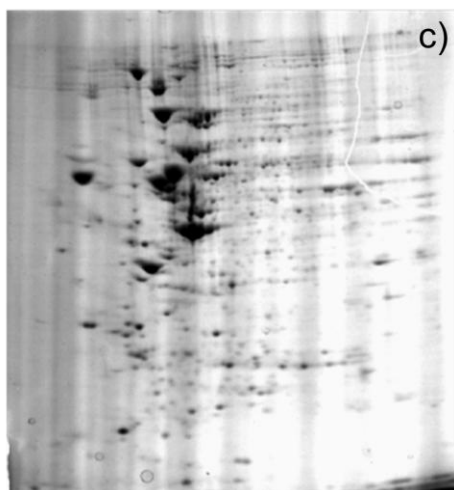
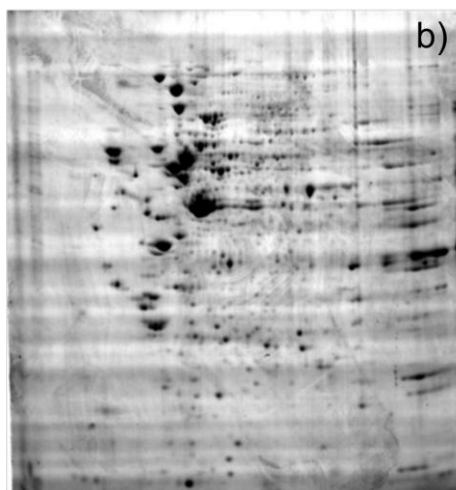
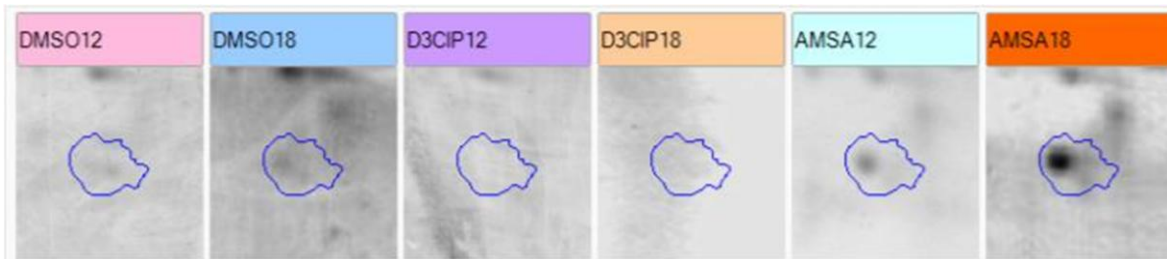


FIGURA 21. Electroforesis en 2 dimensiones de proteínas de células HeLa (750 microgramos) a 18 horas de tratamiento con a) y b) DMSO, c)D3CIP y d)m-AMSA a 25 μ M. pH 3-10, 17 cm, tinción con azul de coomassie.

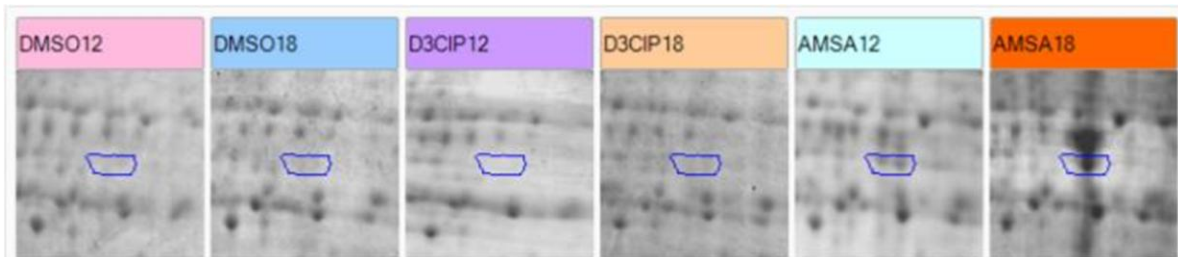
Al correlacionar la viabilidad con el patrón proteómico, se puede inferir que a estos tiempos, en ambos tratamientos ya se están llevando a cabo los procesos relacionados con apoptosis celular (53). Se identificaron alrededor de 450 proteínas en los geles de dos dimensiones, en los cuales se observaron diferencias entre los tratamientos a 12 y 18 horas, según el fármaco utilizado.

Al comparar los patrones, se observó que había proteínas que cambiaban por efecto de los tratamientos utilizados. Por ejemplo, proteínas que aumentaban su concentración con el tratamiento con m-AMSA (1, 2 y 3 en Fig. 22). También, se identificaron proteínas que aumentaban con los tratamientos con D3CIP y m-AMSA (4 y 5 en Fig. 22). Así también, se identificaron cambios en proteínas que eran específicas del tratamiento con D3CIP cuando eran comparadas con el vehículo y la m-AMSA (6, 7, 8, 9 y 10 en Fig. 22).

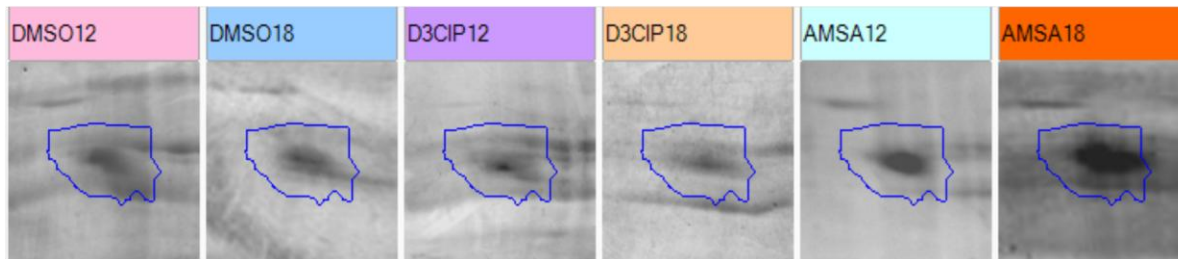
1



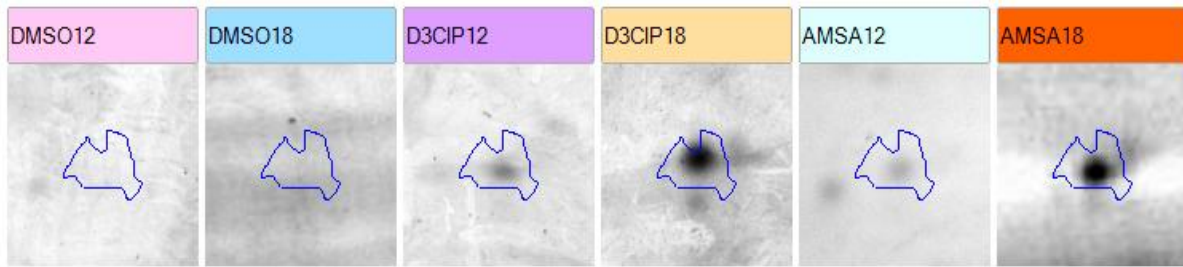
2



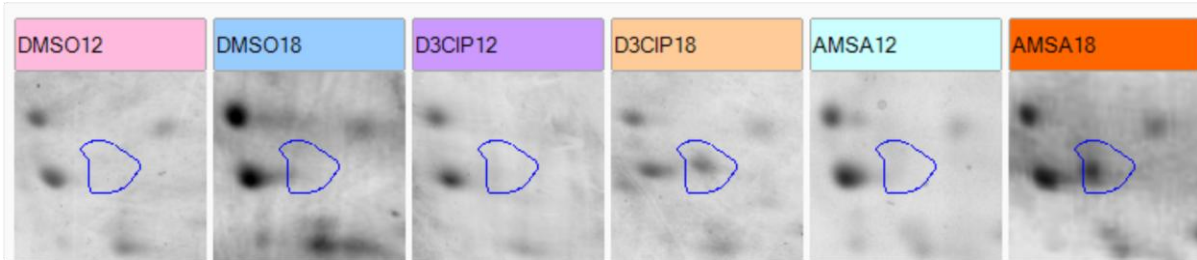
3



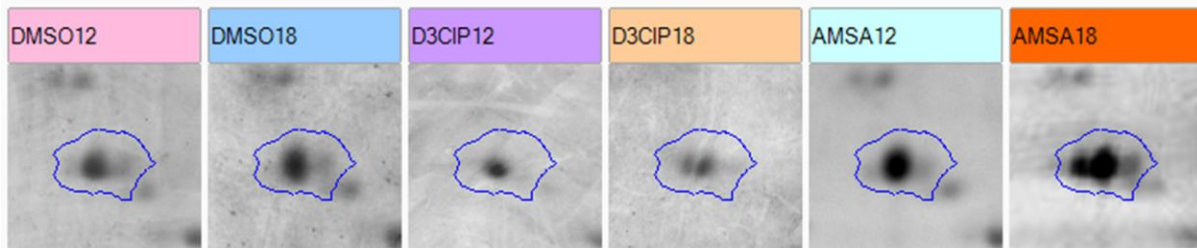
4.- Ck-18



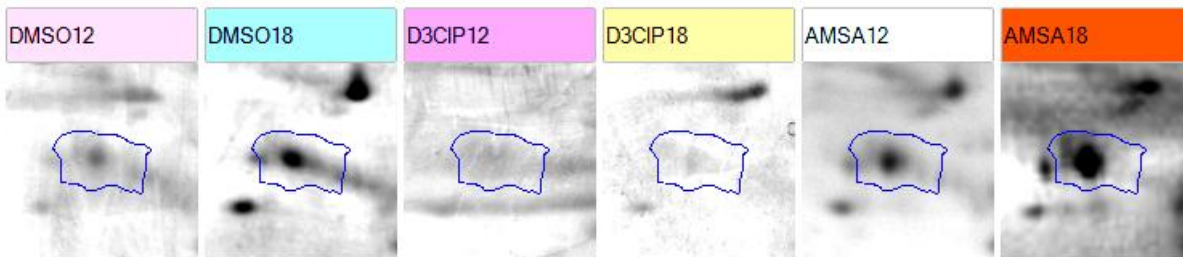
5



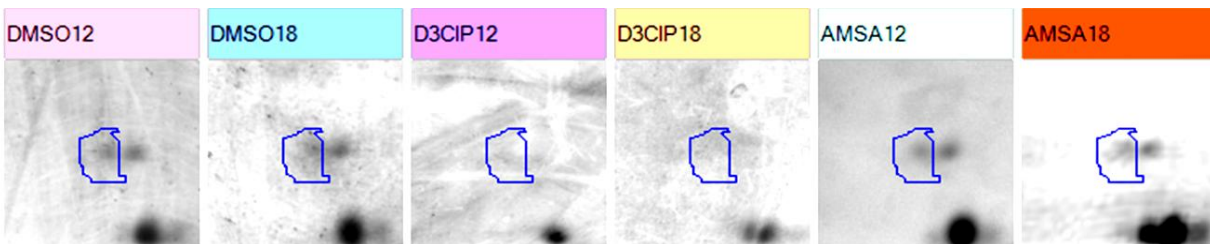
6



7.- Calumenina



8.- NAC-alpha



9.- Paratimosina



10.- Protimosina- α

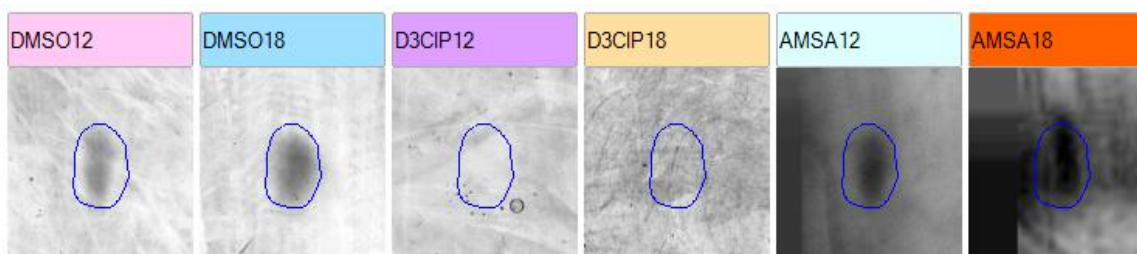


FIGURA 22. Proteínas en las que se muestra el efecto de los tratamientos DMSO (vehículo), D3CIP 25 μ M y m-AMSA 25 μ M a 12 y 18 horas de incubación.

Se identificaron por espectrometría de masas las proteínas de la tabla 6, donde se muestra la secuencia identificada tanto en MASCOT como en Protein PILOT. Estas proteínas han sido relacionadas con procesos apoptóticos, con procesos de transdiferenciación celular, con respuesta a estrés de retículo endoplásmico (UPR) y con la movilización de Ca^{2+} en este compartimento.

TABLA 6. Identificaciones de algunos de los péptidos mostrados en la Fig.22.

Identificación	Secuencia	Identificador de Acceso
Calumenina	WILPSDYDHAEAEARHLVY	Q6IAW5
NAC α	DVKLVMSQANVSR	E9PAV3
Protimosina α	GEEEDGDEDEEAESATGKR	Q15204
Ck 18	LEAEIATYRR	P05783
Paratimosina	AAEEEDEADPKR	P20962

9.- Análisis de resultados

Se evaluó el efecto que tienen diversos compuestos en la topología del ADN, entre ellos, conocidos intercalantes como el EtBr y la m-AMSA, los cuales, como era de esperarse, produjeron un cambio en la topología del plásmido superenrollado pHOT-1, dando como resultado un retardamiento electroforético (Fig.15 y 16). Al emplear cisplatino, éste produjo un entrecruzamiento entre las cadenas de ADN, dando lugar a diferentes especies con migración diversa (Fig.16). La m-AMSA produce un pequeño retardo en la migración del plásmido pHOT (Fig. 16), lo que coincide con su capacidad para desplazar EtBr en ensayos en espectrofluorométricos(4). En concordancia, los derivados de tiazolo[5,4b]quinolina ensayados no son capaces de inducir retardo del plásmido (Fig. 16) (4), ya que su habilidad para desplazar EtBr es considerablemente inferior a la de m-AMSA. El D3CIP no afectó la migración del ADN, por lo que, en este sistema experimental, no se observó que las tiazoloquinolinas afecten la topología del ADN. A pesar de que la m-AMSA es un intercalante menos efectivo que el EtBr, la formación de complejos de ruptura en DTi II-ADN-m-AMSA sí fue detectada en el ADN de células HeLa tratadas con este fármaco (Fig. 17). Al evaluar la formación de estos complejos, no se observó la estabilización de los mismos cuando se empleó el D3CIP (Fig. 17), por lo que los resultados anteriores indican que el blanco farmacológico es diferente al de su isómero. Por otro lado, ambos compuestos inducen la fosforilación de la histona γ H2Ax, proteína clave en la reparación a daño por ruptura de doble cadena (Fig. 20) (65). Para tratar de dilucidar la diana farmacológica, se montó una estrategia proteómica empleando geles en dos dimensiones y análisis por espectrometría de masas, en los cuales, se observaron diferencias entre células tratadas con el vehículo (DMSO), el D3CIP 25 μ M y la m-AMSA 25 μ M (Fig. 21 y 22). A partir de los patrones obtenidos se analizaron los geles empleando el software *Samespot* (Progenesis®), de los cuales, se resolvieron alrededor de 450 manchas, habiendo un total de 15 cuya intensidad sufrió variaciones significativas (SD +/- 2). De las manchas diferencialmente encontradas, se identificaron por espectrometría de masas las proteínas presentadas en la tabla 6.

Entre las proteínas cuyo contenido relativo presentó variaciones significativas entre el control y los tratamientos con D3CIP, aquellas identificadas y que tienen funciones conocidas se describen a continuación:

La proteína NAC α es una de las primeras proteínas que entran en contacto con los polipéptidos recién sintetizados por el sistema traduccional y se propone que es parte esencial de la red de chaperonas citosólicas (66). Su función principal consiste en evitar una incorrecta translocación

de proteínas a retículo endoplásmico, aun cuando éstas no cuenten con un péptido señal para su exportación a retículo endoplásmico (67). La pérdida de NAC α a tiempos cortos es característica de una afectación en el retículo endoplásmico debida a la incapacidad de las chaperonas citosólicas y de retículo endoplásmico, de plegar correctamente las proteínas recién sintetizadas, lo que a la larga produce una respuesta denominada Respuesta a Proteínas Desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés) (68). En experimentos donde se usa RNAi para reducir la cantidad de NAC α en células en cultivo, se produce una UPR, y si no se remedia esta afectación, la respuesta induce la apoptosis por vía intrínseca (68). La reducción de NAC α por los tratamientos con D3CIP (Fig. 22) podría ser parte de una respuesta a proteínas desplegadas, generada directa o indirectamente por el tratamiento, o provenir de una estimulación indirecta de la vía, mediada por una regulación cruzada entre ésta y otra vía asociada, aunque se requieren más experimentos para demostrar esta hipótesis.

A su vez, la proteína calumenina está relacionada con la inhibición de ciertas proteínas en retículo endoplásmico, además de su conocida unión a calcio, ion importante en la señalización celular (69). Su disminución en el tratamiento con D3CIP a tiempos cortos (12 horas) podría estar relacionada con cambios en la concentración citosólica de calcio, siendo ésta una de las señales características de apoptosis celular. La movilización de calcio hacia la mitocondria, produce la ruptura de la membrana mitocondrial externa, la consecuente liberación del citocromo C y la formación del apoptosoma (70). La proteína Calumenina también interacciona con SERCA, la cual es una bomba de calcio que regula la concentración de este ion en el retículo endoplásmico (71). La movilidad del Ca²⁺ entre diferentes regiones, además de estar conectada con procesos apoptóticos, también guarda estrecha relación con el inicio y progresión de la UPR y de la autofagia (70). Se ha visto también que la proteína calumenina cambia su localización del retículo al citosol y a la membrana plasmática durante un arresto en la mitosis y en la entrada a la apoptosis, respectivamente (72).

Protimosina- α es una proto-oncoproteína nuclear involucrada en procesos de transcripción y proliferación celular, con una marcada función antiapoptótica. Se trata de un factor remodelador de la cromatina importante, dada sus interacciones con la histona H1 y con la acetilasa de histonas p300 (73). Se ha visto aumentada en distintos tipos de cánceres, observándose una correlación entre su concentración celular y la progresión del cáncer de mama, hígado, pulmón y colon (74). El tratamiento con D3CIP (a diferencia del tratamiento con m-AMSA) disminuye la cantidad de protimosina- α , disminución que está relacionada con efectos apoptóticos bien definidos. Uno de los sustratos de caspasa 3 es protimosina- α . Cuando ésta es proteolizada, la

interacción con la proteína Apaf-1 se pierde, permitiendo que Apaf-1 se una a procaspasa 9 y al citocromo C, produciendo un apoptosoma funcional (75). La ruptura genera también un cambio en su localización celular, pasando de estar ubicada en el núcleo a ser expuesta en la cara externa de la membrana plasmática, exposición que se cree, regula células de la respuesta inmune (75).

La paratimosina es una proteína ácida que une Zn^{2+} de ubicación nuclear, y que se asocia, principalmente con orígenes de duplicación del ADN (76). Además, se tiene evidencia de la interacción y coactivación con el receptor de glucocorticoides, el cual es un factor de transcripción que durante procesos apoptóticos regula la actividad de proteínas pro (BAM, BIM y BAX) y antiapoptóticas (BCL-2, BCL2-XL) en células T que han sido tratadas con glucocorticoides (77, 78). Se ha visto también que su reducción por microRNA-22 es un paso clave en el proceso de diferenciación celular (79), por lo que esta proteína podría estar relacionada con procesos de adaptabilidad celular durante el desarrollo del proceso tumorigénico, aunque su actividad en estos procesos no ha sido estudiada.

Finalmente, citoqueratina 18 (Ck 18) es una proteína que forma parte del citoesqueleto, con funciones diversas durante los cambios de morfología asociados a la progresión del ciclo celular y diferenciación celular (80). La ruptura de Ck 18 por caspasas 3, 6 y 7 en el residuo 238 es un evento temprano durante la apoptosis por vía intrínseca, precediendo la fragmentación del ADN y los cambios en la asimetría de la membrana que conducen a la formación de cuerpos apoptóticos (80, 81). En nuestros experimentos, Ck18 se observa lejos del peso molecular del polipéptido completo (45 KDa), por lo que presumiblemente se trate de un fragmento de degradación. A las 12 horas, ambos fármacos ya han producido cambios considerables en la morfología (Fig. 18), lo que coincide con una importante acumulación del fragmento Ck18 para ambos tratamientos (Fig. 25). Al analizar los fragmentos obtenidos en las espectrometrías de masas, se observa que todos estos caen en la región posterior al residuo 238, por lo que presumiblemente se trate de la proteína escindida (Tabla 7). Se ha observado la ruptura de Ck18 en tratamientos con el inhibidor de topoisomerasa II doxorubicina, y, que esta proteólisis es característica de una respuesta efectiva a quimioterapia en cáncer de mama (82). Este proceso también tiene relación con la activación previa de la UPR en un estudio realizado en células apoptóticas de fibrosis idiopática pulmonar (83).

TABLA 7. Secuencia de aminoácidos de Ck18 en la que se presentan en rojo los péptidos identificados por espectrometría de masas. En verde (A248) se marca el sitio de corte blanco de caspasa 6 y en amarillo el sitio de corte por caspasas 3, 7 y 9.

10	20	30	40	50	60
MSFTTRSTFS	TNYRSLGSVQ	APSYGARPVS	SAASVYAGAG	GSGSRISVSR	STSFRRGGMGS
70	80	90	100	110	120
GGLATGIAGG	LAGMGGIQNE	KETMQSLNDR	LASYLDRVRS	LETENRRLES	KIREHLEKKG
130	140	150	160	170	180
PQVRDWSHYF	KIIEDLRAQI	FANTVDNARI	VLQIDNARLA	ADDFRVKYET	ELAMRQSVEN
190	200	210	220	230	240
DIHGLRKVID	DTNITRLQLE	TEIEALKEEL	LFMKNHEEE	VKGLQAQIAS	SGLTVEV D/AP
250	260	270	280	290	300
KSQDLAKIMA	DIR AQYDELA	RKNREELDKY	WSQQIEESTT	VVTTQSAEVG	AAETTLTELRL
310	320	330	340	350	360
RTV QSLEIDL	DSMRNL KASL	EN SLRE VEAR	YALQMEQLNG	ILLHLESELA	QTRAEGQRQA
370	380	390	400	410	420
QEYEALLNIK	VKLEAEIATY	RRLLEDGEDF	NLGDAL D/S SN	SMQTIQKTTT	RRIVDGRVVS
430					
ETNDTKVLRH					

Con las diferencias encontradas entre los tratamientos con m-AMSA y D3CIP, se asume que la respuesta de las células a los tratamientos es diferente y que la diana farmacológica lo es también, a pesar de que cuentan con efectos en común (fosforilación de la histona γ H2Ax y proteínas identificadas en los patrones 2D), hay otras variaciones que nos indican que no comparten la diana farmacológica. Dentro de estas, la formación de los complejos covalentes, el cambio en la migración del ADN en los ensayos de retardo, y las proteínas diferencialmente encontradas, indican un mecanismo de acción diferente de las tiazolo[5,4]b-quinolinas al de su isómero, la m-AMSA.

Se sabe que la activación de la UPR y el consecuente inicio de procesos autofágicos, confiere a la célula la habilidad de reducir el efecto de fármacos citotóxicos (84, 85). Sin embargo, dependiendo de la duración y el grado de estrés, la activación de esta vía puede desencadenar programas de muerte celular (86, 87, 88). La finalidad de esta respuesta radica en disminuir el exceso de proteínas desplegadas en retículo endoplásmico, producto de diversas afectaciones, tales como hipoxia, daño al ADN, estrés oxidativo, cambios en las concentraciones de Ca^{2+} y afectaciones en el metabolismo celular. A futuro, se requiere evaluar una posible activación de estos mecanismos, como respuesta celular al daño al ADN o a las distintas afectaciones que podrían iniciarse por el tratamiento con las tiazoloquinolinas.

10. Conclusiones

- Se determinó que el D3CIP no comparte el mecanismo de acción de su isómero la m-AMSA.
- El tratamiento con D3CIP produce una respuesta al daño al material genético.
- Se identificaron cambios en el proteoma de células HeLa cuando se trataron con D3CIP y estos cambios se asocian a eventos apoptóticos y a la activación de respuestas derivadas de estrés en retículo endoplásmico.

11.- Bibliografía

1. Rodríguez-Loaiza P, Quintero A, Rodríguez-Sotres R, Solano JD, Lira-Rocha A. Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. *Eur J Med Chem.* 2004 Jan; 39(1):5-10. PubMed PMID: 4987829.
2. Kell J. Treatment of relapsed acute myeloid leukaemia. *Rev Recent Clin Trials.* 2006 May; 1(2):103-11. Review. PubMed PMID: 18473961.
3. Rogojina AT, Nitiss JL. Isolation and characterization of mAMSA-hypersensitive mutants. Cytotoxicity of Top2 covalent complexes containing DNA single strand breaks. *J Biol Chem.* 2008 Oct 24;283(43):29239-50. doi: 10.1074/jbc.M804058200. Epub 2008 Aug 22. PubMed PMID: 18723844; PubMed Central PMCID: PMC2570872.
4. Loza-Mejía MA, Maldonado-Hernández K, Rodríguez-Hernández F, Rodríguez-Sotres R, González-Sánchez I, Quintero A, Solano JD, Lira-Rocha A. Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2008 Feb 1;16(3):1142-9. Epub 2007 Oct 30. PubMed PMID: 18035542.
5. Páez-Franco, J. C. Efecto de nuevos derivados de tiazoloquinolinas sobre la actividad de la ADN-Topoisomerasa en ensayos *in vitro* Tesis de Licenciatura. Q.F.B. Facultad de Química, UNAM.2011.
6. González-Sánchez, I. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímica, UNAM. 2009.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. Review. PubMed PMID: 21376230.
8. Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet.* 2010;70:27-56. doi: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. Review. PubMed PMID: 20920744.
9. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4;100(3):776-81. Epub 2003 Jan 27. Review. PubMed PMID: 12552134; PubMed Central PMCID: PMC298677.
10. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.* 2008 Oct;6(10):1521-33. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203. PubMed PMID: 18922968; PubMed Central PMCID: PMC2740918.
11. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008 Sep;8(9):671-82. doi: 10.1038/nrc2399. Review. PubMed PMID: 18650841.
12. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene.* 2007 Feb 26;26(9):1324-37. Review. PubMed PMID: 17322918; PubMed Central PMCID: PMC2930981.
13. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005 Aug;6(8):611-22. Review. PubMed PMID: 16136653.
14. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):353-64. Review. PubMed PMID: 8756718.

15. Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2009 Oct;19(5):329-37. doi: 10.1016/j.semcancer.2009.05.003. Epub 2009 May 29. Review. PubMed PMID: 19482086.
16. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Jun;29(6):789-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663. Epub 2009 Jan 22. Review. PubMed PMID: 19164810.
17. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.015. Review. PubMed PMID: 20371345; PubMed Central PMCID: PMC2862057.
18. Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Mar;65(5):700-12. doi: 10.1007/s00018-007-7486-z. Review. PubMed PMID: 18193162; PubMed Central PMCID: PMC2752021.
19. Nagy JA, Chang SH, Shih SC, Dvorak AM, Dvorak HF. Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Apr;36(3):321-31. doi: 10.1055/s-0030-1253454. Epub 2010 May 20. Review. PubMed PMID: 20490982; PubMed Central PMCID: PMC3278036.
20. Berx G, van Roy F. Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a003129. doi: 10.1101/cshperspect.a003129. Epub 2009 Sep 23. Review. PubMed PMID: 20457567; PubMed Central PMCID: PMC2882122.
21. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):118-32. Review. PubMed PMID: 14964308.
22. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5649-69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1040. Epub 2010 Jul 7. Review. PubMed PMID: 20610625.
23. Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, Brown DR, Barr E, Alvarez FB, Chiacchierini LM, Jansen KU; Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med.* 2002 Nov 21;347(21):1645-51. PubMed PMID: 12444178.
24. D.E. Thurston, *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*, ed. CRC Press SA. 2007.
25. Tanious FA, Spsychala J, Kumar A, Greene K, Boykin DW, Wilson WD. Different binding mode in AT and GC sequences for unfused-aromatic dications. *J Biomol Struct Dyn.* 1994 Apr;11(5):1063-83. PubMed PMID: 7946061.
26. Ren J, Chaires JB. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry.* 1999 Dec 7;38(49):16067-75. PubMed PMID: 10587429.
27. Avendaño C., Menéndez J.C. *Medicinal Chemistry of anticancer drugs*, 1a Ed. 200-205. Elsevier Science Publishing Company. 2008.
28. Berman HM, Young PR. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 1981;10:87-114. Review. PubMed PMID: 7020585.
29. Braña MF, Cacho M, Gradillas A, de Pascual-Teresa B, Ramos A. Intercalators as anticancer drugs. *Curr Pharm Des.* 2001 Nov;7(17):1745-80. Review. PubMed PMID: 11562309.

30. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*. 2007 Apr;89(4):427-46. Epub 2007 Jan 4. Review. PubMed PMID: 17293019.
31. Voet,D.; Voet,J.G.; Pratt,C.W. *Fundamentals of Biochemistry*. 2nd edn. John Wiley & Sons, Hoboken, N.J. 2006.
32. Mizuuchi K, Fisher LM, O'Dea MH, Gellert M. DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Apr;77(4):1847-51. PubMed PMID: 6246508; PubMed Central PMCID: PMC348605.
33. Roca J, Ishida R, Berger JM, Andoh T, Wang JC. Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 1;91(5):1781-5. PubMed PMID:8127881; PubMed Central PMCID: PMC43247.
34. Chène P, Rudloff J, Schoepfer J, Furet P, Meier P, Qian Z, Schlaeppli JM, Schmitz R, Radimerski T. Catalytic inhibition of topoisomerase II by a novel rationally designed ATP-competitive purine analogue. *BMC Chem Biol*. 2009 Jan 7;9:1. doi: 10.1186/1472-6769-9-1. PubMed PMID: 19128485; PubMed Central PMCID: PMC2628638.
35. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009 May;9(5):338-50. doi: 10.1038/nrc2607. Epub 2009 Apr 20. Review. PubMed PMID: 19377506; PubMed Central PMCID: PMC2748742.
36. McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res*. 2007 Oct 1;623(1-2):83-97. Epub 2007 Jul 3. Review. PubMed PMID:17681352; PubMed Central PMCID: PMC2679583.
37. Bjergbaek L, Kingma P, Nielsen IS, Wang Y, Westergaard O, Osheroff N, Andersen AH. Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of human topoisomerase IIalpha. *J Biol Chem*. 2000 Apr 28;275(17):13041-8. PubMed PMID: 10777608.
38. Pommier Y, Cherfils J. Interfacial inhibition of macromolecular interactions: nature's paradigm for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*. 2005 Mar;26(3):138-45. Review. PubMed PMID: 15749159.
39. Freudenreich CH, Kreuzer KN. Localization of an aminoacridine antitumor agent in a type II topoisomerase-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Nov 8;91(23):11007-11. PubMed PMID: 7971998; PubMed Central PMCID: PMC45155.
40. Capranico G, Binaschi M. DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 1;1400(1-3):185-94. Review. PubMed PMID: 9748568.
41. Robinson MJ, Martin BA, Gootz TD, McGuirk PR, Moynihan M, Sutcliffe JA, Osheroff N. Effects of quinolone derivatives on eukaryotic topoisomerase II. A novel mechanism for enhancement of enzyme-mediated DNA cleavage. *J Biol Chem*. 1991 Aug 5;266(22):14585-92. PubMed PMID: 1650363.

42. Sung, W.J.; Kim, D. H.; Sohn, S. K.; Kim, J. G.; Baek, J. H.; Jeon, S. B. Phase II trial of amsacrine plus intermediate-dose Ara-C (IDAC) with or without etoposide as salvage therapy for refractory or relapsed acute leukemia. *Jpn J Clin Oncol.* 35, 612. 2005.
43. Chourpa I, Morjani H, Riou JF, Manfait M. Intracellular molecular interactions of antitumor drug amsacrine (m-AMSA) as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy. *FEBS Lett.* 1996 Nov 11;397(1):61-4. PubMed PMID: 8941714.
44. Wasserman RA, Wang JC. Analysis of yeast DNA topoisomerase II mutants resistant to the antitumor drug amsacrine. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1795-800. PubMed PMID: 8137294.
45. Liu YX, Hsiung Y, Jannatipour M, Yeh Y, Nitiss JL. Yeast topoisomerase II mutants resistant to anti-topoisomerase agents: identification and characterization of new yeast topoisomerase II mutants selected for resistance to etoposide. *Cancer Res.* 1994 Jun 1;54(11):2943-51. PubMed PMID: 8187080.
46. Houlbrook S, Addison CM, Davies SL, Carmichael J, Stratford IJ, Harris AL, Hickson ID. Relationship between expression of topoisomerase II isoforms and intrinsic sensitivity to topoisomerase II inhibitors in breast cancer cell lines. *Br J Cancer.* 1995 Dec;72(6):1454-61. Erratum in: *Br J Cancer* 1996 Oct;74(7):1154. PubMed PMID: 8519659; PubMed Central PMCID: PMC2034103.
47. Demeunynck, M. Antitumour acridines. *Exp. Opin. Ther. Pat.* 14, 55-70. 2004.
48. Lerman LS. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol.* 1961 Feb;3:18-30. PubMed PMID: 13761054.
49. Lauricella M, Giuliano M, Emanuele S, Carabillò M, Vento R, Tesoriere G. Increased cyclin E level in retinoblastoma cells during programmed cell death. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1998 Dec;44(8):1229-35. PubMed PMID: 9874510.
50. Alvarez-Ibarra C, Fernández-Granda R, Quiroga ML, Carbonell A, Cárdenas F, Giralt E. Synthesis and antitumor evaluation of new thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *J Med Chem.* 1997 Feb 28;40(5):668-76. PubMed PMID: 9057853.
51. López-Rodríguez, A.K. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. 2009.
52. Reyes-Rangel, F.J. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. 2009.
53. González-Sánchez I, Solano JD, Loza-Mejía MA, Olvera-Vázquez S, Rodríguez-Sotres R, Morán J, Lira-Rocha A, Cerbón MA. Antineoplastic activity of the thiazolo[5,4-b]quinoline derivative D3CLP in K-562 cells is mediated through effector caspases activation. *Eur J Med Chem.* 2011 Jun;46(6):2102-8. doi:10.1016/j.ejmech.2011.02.063. Epub 2011 Mar 3. PubMed PMID: 21420205.
54. Muroi M, Kazami S, Noda K, Kondo H, Takayama H, Kawatani M, Usui T, Osada H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem Biol.* 2010 May 28;17(5):460-70. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.03.016. PubMed PMID: 20534344.

55. Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):208-15. Review. PubMed PMID: 12634794.
56. Bertucci F, Birnbaum D, Goncalves A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Oct;5(10):1772-86. Epub 2006 May 29. Review. PubMed PMID: 16733261.
57. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975 May 25;250(10):4007-21. PubMed PMID: 236308; PubMed Central PMCID: PMC2874754.
58. Bravo R, Bellatin J, Celis JE. [35S]-methionine labelled polypeptides from HELA cells. Coordinates and percentage of some major polypeptides. *Cell Biol Int Rep*. 1981 Jan;5(1):93-6. PubMed PMID: 7226243.
59. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000 Apr;21(6):1037-53. Review. PubMed PMID: 10786879.
60. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR. Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev*. 2004 Jan-Feb;23(1):34-44. Review. PubMed PMID: 14625891.
61. Celis JE, Gromov P. Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell*. 2003 Jan;3(1):9-15. Review. PubMed PMID: 12559171.
62. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):198-207. Review. PubMed PMID: 12634793.
63. Haldane, A.; Sullivan, D. M. *En Methods in Molecular Biology v. 95. DNA topoisomerase protocols, Part II: Enzymology and drugs*; Osheroff, N., Biornst, N. A., Eds.; Humana Press: Totowa NJ, 2001.
64. Kepp O, Galluzzi L, Lipinski M, Yuan J, Kroemer G. Cell death assays for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Mar;10(3):221-37. doi: 10.1038/nrd3373. Review. PubMed PMID: 21358741.
65. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol*. 2000 Jul 27-Aug 10;10(15):886-95. PubMed PMID:10959836.
66. Preissler S, Deuerling E. Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. *Trends Biochem Sci*. 2012 Jul;37(7):274-83. doi: 10.1016/j.tibs.2012.03.002. Epub 2012 Apr 13. Review. PubMed PMID: 22503700.
67. Lauring B, Sakai H, Kreibich G, Wiedmann M. Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5411-5. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Aug 15;92(17):8088. PubMed PMID: 7777521; PubMed Central PMCID: PMC41704.

68. Hotokezaka Y, van Leyen K, Lo EH, Beatrix B, Katayama I, Jin G, Nakamura T. alphaNAC depletion as an initiator of ER stress-induced apoptosis in hypoxia. *Cell Death Differ.* 2009 Nov;16(11):1505-14. doi: 10.1038/cdd.2009.90. Epub 2009 Jul 17. PubMed PMID: 19609276.
69. Sahoo SK, Kim do H. Characterization of calumenin in mouse heart. *BMB Rep.* 2010 Mar;43(3):158-63. Review. PubMed PMID: 20356454.
70. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Jul;4(7):552-65. Review. PubMed PMID: 12838338.
71. Sahoo SK, Kim T, Kang GB, Lee JG, Eom SH, Kim do H. Characterization of calumenin-SERCA2 interaction in mouse cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2009 Nov 6;284(45):31109-21. doi: 10.1074/jbc.M109.031989. Epub 2009 Sep 9. PubMed PMID: 19740751; PubMed Central PMCID: PMC2781510.
72. Bull VH, Fargestad EM, Strozynski M, Thiede B. Temporal proteome profiling of taxol-induced mitotic arrest and apoptosis. *Electrophoresis.* 2010 Jun;31(11):1873-85. doi: 10.1002/elps.200900780. PubMed PMID: 20506421.
73. Orre RS, Cotter MA 2nd, Subramanian C, Robertson ES. Prothymosin alpha functions as a cellular oncoprotein by inducing transformation of rodent fibroblasts in vitro. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1794-9. Epub 2000 Oct 17. PubMed PMID: 11036085.
74. Suzuki S, Takahashi S, Takahashi S, Takeshita K, Hikosaka A, Wakita T, Nishiyama N, Fujita T, Okamura T, Shirai T. Expression of prothymosin alpha is correlated with development and progression in human prostate cancers. *Prostate.* 2006 Apr 1;66(5):463-9. PubMed PMID: 16353248.
75. Evstafieva AG, Belov GA, Rubtsov YP, Kalkum M, Joseph B, Chichkova NV, Sukhacheva EA, Bogdanov AA, Pettersson RF, Agol VI, Vartapetian AB. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp Cell Res.* 2003 Apr 1;284(2):211-23. PubMed PMID: 12651154.
76. Vareli K, Frangou-Lazaridis M, van der Kraan I, Tsolas O, van Driel R. Nuclear distribution of prothymosin alpha and parathymosin: evidence that prothymosin alpha is associated with RNA synthesis processing and parathymosin with early DNA replication. *Exp Cell Res.* 2000 May 25;257(1):152-61. PubMed PMID: 10854063.
77. Wu I, Shin SC, Cao Y, Bender IK, Jafari N, Feng G, Lin S, Cidlowski JA, Schleimer RP, Lu NZ. Selective glucocorticoid receptor translational isoforms reveal glucocorticoid-induced apoptotic transcriptomes. *Cell Death Dis.* 2013 Jan 10;4:e453. doi: 10.1038/cddis.2012.193. PubMed PMID: 23303127; PubMed Central PMCID: PMC3563981.
78. Okamoto K, Isohashi F. Macromolecular translocation inhibitor II (Zn(2+)-binding protein, parathymosin) interacts with the glucocorticoid receptor and enhances transcription in vivo. *J Biol Chem.* 2005 Nov 4;280(44):36986-93. Epub 2005 Sep 2. PubMed PMID: 16150697.
79. Chen HL, Huang JY, Chen CM, Chu TH, Shih C. MicroRNA-22 can reduce parathymosin expression in transdifferentiated hepatocytes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34116. doi:

10.1371/journal.pone.0034116. Epub 2012 Apr 6. PubMed PMID: 22493679; PubMed Central PMCID: PMC3320904.

80. Schutte B, Henfling M, Kölgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, Nap M, Björklund V, Björklund P, Björklund B, Lane EB, Omary MB, Jörnvall H, Ramaekers FC. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res*. 2004 Jul 1;297(1):11-26. PubMed PMID: 15194421.
81. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R. Apoptosis of human prostate androgen-dependent and -independent carcinoma cells induced by an isopropanolic extract of black cohosh involves degradation of cytokeratin (CK) 18. *Anticancer Res*. 2005 Jan-Feb;25(1A):139-47. PubMed PMID: 15816531.
82. Olofsson MH, Ueno T, Pan Y, Xu R, Cai F, van der Kuip H, Muerdter TE, Sonnenberg M, Aulitzky WE, Schwarz S, Andersson E, Shoshan MC, Havelka AM, Toi M, Linder S. Cytokeratin-18 is a useful serum biomarker for early determination of response of breast carcinomas to chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 1;13(11):3198-206. PubMed PMID: 17545523.
83. Cha SI, Ryerson CJ, Lee JS, Kukreja J, Barry SS, Jones KD, Elicker BM, Kim DS, Papa FR, Collard HR, Wolters PJ. Cleaved cytokeratin-18 is a mechanistically informative biomarker in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2012 Nov 20;13:105. doi: 10.1186/1465-9921-13-105. PubMed PMID: 23167970; PubMed Central PMCID: PMC3547729.
84. Gray MD, Mann M, Nitiss JL, Hendershot LM. Activation of the unfolded protein response is necessary and sufficient for reducing topoisomerase II α protein levels and decreasing sensitivity to topoisomerase-targeted drugs. *Mol Pharmacol*. 2005 Dec;68(6):1699-707. Epub 2005 Sep 1. PubMed PMID: 16141312.
85. Mann MJ, Pereira ER, Liao N, Hendershot LM. UPR-induced resistance to etoposide is downstream of PERK and independent of changes in topoisomerase II α levels. *PLoS One*. 2012;7(10):e47931. doi: 10.1371/journal.pone.0047931. Epub 2012 Oct 29. PubMed PMID: 23144714; PubMed Central PMCID: PMC3483293.
86. Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el-H, Fonteriz RI, Alvarez J, Mollinedo F. Antitumor alkyllysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene*. 2012 May 24;31(21):2627-39. doi: 10.1038/onc.2011.446. Epub 2011 Nov 7. PubMed PMID: 22056873.
87. Benbrook DM, Long A. Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol*. 2012 Oct;34(3):286-97. PubMed PMID: 23070014.
88. Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Métivier D, Maiuri MC, Kroemer RT, Kroemer G. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene*. 2011 Nov 10;30(45):4544-56. doi: 10.1038/onc.2011.168. Epub 2011 May 16. PubMed PMID: 21577201.