



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE 5 DERIVADOS DE
QUINAZOLINA EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA

CIRCE MARTHA ALICIA MOURET HERNÁNDEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2016



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesora: Elena Guadalupe Ramírez López

SECRETARIO: Profesor: Francisco Sánchez Bartz

1ER. SUPLENTE: Profesora: Krutzkaya Juárez Reyes

2° SUPLENTE: Profesor: Francisco Hernández Luis

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Unidad de Investigación Preclínica. Edificio E. Facultad de Química.
Ciudad Universitaria. UNAM**

Asesor del tema: Francisco Sánchez Bartz _____

Supervisor técnico: Francisco Hernández Luis _____

Sustentante: Circe Martha Alicia Mouret Hernández _____

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes instituciones por el apoyo brindado:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar mis estudios profesionales

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida para la realización de esta tesis como parte del proyecto CONACYT CB 220664 “Estudios de derivados de quinazolina como agentes quimiopreventivos del proceso carcinogénico”

A la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química, por permitirme llevar a cabo el trabajo experimental dentro de sus instalaciones

De igual forma, agradezco a las siguientes personas:

A mi asesor, el M. en C. Francisco Sánchez Bartz por permitir integrarme a su grupo de trabajo, por confiar en mí, brindarme sus conocimientos y dejarme conocerlo más que como asesor, como persona.

Al Dr. Francisco Hernández Luis, por acompañarme durante largo tiempo en mi vida académica, por el apoyo incondicional que me ha brindado y los conocimientos transmitidos.

A la M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora por todas las facilidades otorgadas durante el desarrollo de este trabajo en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC).

A la Bióloga Ana Mora Moreno, por ser una gran amiga y compañera de trabajo, aprendí mucho de ti y cada momento fue ameno gracias a tu compañía y enseñanzas.

A los miembros de jurado por tomar tiempo para la revisión del presente trabajo y por sus aportaciones al mismo.

Glosario

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BdrU: 5-bromo-2-desoxiuridina

DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol

DiFAC: Diseño de fármacos asistido por computadora

DHFR: Dihidrofolato reductasa

FAH4: Tetrahidrofolato

GSH: Glutación

h: Horas

HTS: High throughput screening

LDH: Lactato deshidrogenasa

Lead: Compuesto líder, que muestra la actividad biológica deseada

min: Minuto

mL: Mililitro

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

NAC: N-acetilcisteína

nm: nanómetros

PABA: ácido *p*-aminobenzoico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

SAR: Estudios de relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés: structure–activity relationship)

SFB: Suero fetal bovino

SRB: Sulforrodamina-B

TAQ: quinazolin-2,4,6-triamina

THF: Tetrahidrofolato

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

QSAR: Estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés: quantitative structure–activity relationship)

WST-1: Disulfonato de 4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno

Índice

1. Introducción	1
1.1 Cáncer.....	1
1.1.1 Importancia del cáncer	2
1.2 Medicamentos contra el cáncer	5
2. Antecedentes	6
2.1 Desarrollo de fármacos	6
2.1.1 Identificación de la diana	6
2.1.2 Validación de la diana.....	6
2.1.3 Generación de nuevos compuestos y selección del lead	7
2.1.4 Optimización del lead y pruebas preclínicas.....	7
2.1.5 Pruebas clínicas	8
2.2 Desarrollo de antineoplásicos	11
2.2.1 Desarrollo de nuevos antineoplásicos	13
2.2.2 Importancia de la química farmacéutica	14
2.2.2.1 Diseños de fármacos	14
2.2.2.1 Diseño de <i>novo</i>	15
2.2.2.1 Estudios SAR.....	15
2.2.2.1 Estudios QSAR.....	15
2.2.3 Pruebas de citotoxicidad.....	16
2.3 Usos de las quinazolininas como antineoplásicos	17
2.3.1 Síntesis de nuevos derivados de quinazolina	18
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1 Objetivos generales	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6. Material y métodos	26
6.1 Materiales y reactivos	26
6.2 Compuestos a evaluar	26
6.3 Líneas celulares	26
6.3.1 HCT-15	27

6.3.2 HeLa	27
6.3.3 MCF7	27
6.3.4 PC-3	27
6.4 Cultivo celular.....	28
6.4.1 Descongelamiento de líneas celulares	29
6.4.2 Proliferación celular	29
6.4.3 Tripsinización	30
6.4.4 Cuantificación celular.....	30
6.5 Pruebas de citotoxicidad	30
6.5.1 Preparación de los compuestos a evaluar	30
6.5.2 Citotoxicidad	31
6.5.1 Tinción con sulforrodamina-B y lectura de placas	33
6.6 Prueba para la exploración del mecanismo de acción de los compuestos ..	33
7. Resultados	35
7.1 Pruebas de citotoxicidad.....	35
7.2 Prueba para la exploración del mecanismo de acción de los compuestos	38
8. Discusión de resultados	40
9. Conclusiones.....	43
10. Apéndice	45
9. Referencias.....	50

1. Introducción

1.1 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales.¹ Es causado por factores externos (tabaco, organismos infecciosos, nutrición inapropiada, productos químicos y radiación) y factores internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunes, y las mutaciones que se producen a partir del metabolismo). Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover su desarrollo.²

Dicha enfermedad, es caracterizada por un aumento desregulado de la proliferación celular y la migración invasiva e incontrolada hacia tejidos secundarios invadiendo tejidos adyacentes o generando metástasis.

Se conocen más de 100 tipos diferentes de cáncer humano. Y, pese a que las células de cáncer comparten algunas características, son muy diferentes debido a su origen embrionario y grado de diferenciación. A continuación se presentan una serie de alteraciones celulares necesarias para permitir el crecimiento maligno:³

- 1) Independencia de las señales de crecimiento
- 2) Insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento
- 3) Inhibición de apoptosis
- 4) Potencial proliferativo ilimitado
- 5) Angiogénesis
- 6) Invasión a los tejidos (metástasis)

Estas características explican por qué, en general, el cáncer es una enfermedad inevitable durante el promedio de vida humana.³ Cualquier persona puede desarrollar cáncer. Diez o más años pasan con frecuencia entre la exposición a los factores externos y la detección de la enfermedad. El

riesgo de ser diagnosticado aumenta con la edad, ya que la mayoría de los tipos de cáncer requieren muchos años para desarrollar.²

1.1.1 Importancia del cáncer

El cáncer es un problema de salud importante, dado que se extiende en todo el mundo y representa una enorme carga para la salud mundial, tocando cada región y grupo socioeconómico (Figura 1). A nivel mundial, una de cada siete muertes se debe al cáncer; esta enfermedad causa más muertes que el SIDA, la tuberculosis y la malaria de forma conjunta.⁴ Cuando los países se agrupan de acuerdo a sus ingresos económicos, el cáncer es la segunda causa principal de muerte en aquellos de ingresos altos; después de las enfermedades cardiovasculares, y la tercera causa principal de muerte en países de ingresos bajos y medianos; después de enfermedades cardiovasculares y enfermedades infecciosas y parasitarias (Tabla 1).⁵

Tabla 1. Causas de muerte en el mundo por nivel de ingresos en 2012⁵

	Nivel mundial			Ingresos bajos y medios			Ingresos altos		
	Lugar	Muertes	%	Lugar	Muertes	%	Lugar	Muertes	%
Enfermedades cardiovasculares	1	17,513	31	1	13,075	30	1	4,438	38
Neoplasias malignas	2	8,204	15	3	5,310	12	2	2,894	25
Enfermedades infecciosas y parasitarias	3	6,431	12	2	6,128	14	7	303	3
Enfermedades respiratorias	4	4,040	7	4	3,395	8	3	645	6
Lesiones no intencionales	5	3,716	7	5	3,212	7	5	504	4
Infecciones respiratorias	6	3,060	5	6	2,664	6	6	396	3
Enfermedades digestivas	7	2,263	4	7	2,664	4	4	515	4
Diabetes Mellitus	8	1,497	3	8	1,243	3	9	245	2
Lesiones intencionales	9	1,428	3	9	1,185	3	10	243	2
Otras causas	10	2,459	5	10	2551	3	8	465	2
Todas las causas		55,843			44,172			11,671	

En los países económicamente desarrollados, los tres tipos más comunes de cáncer fueron la próstata, pulmón y colorrectal en varones, y mama, colorrectal y pulmón en mujeres. Mientras que en los países en vías de desarrollo económico, los tres tipos de cáncer más diagnosticados fueron pulmón, hígado y estómago en hombres, y de mama, cuello uterino y pulmón en las mujeres (Figura 1).⁵

Así, manera global, el cáncer constituye un gran problema de salud. Y a pesar de los tratamientos que prolongan la supervivencia, los avances en la terapia del cáncer no han reducido significativamente la tasa de mortalidad a escala mundial.³

Por otra parte, la carga mundial del cáncer está creciendo a un ritmo alarmante; para el 2030 se esperan alrededor de 21.7 millones de nuevos casos y 13 millones de muertes. Estas cifras se pueden aumentar aún más debido a la adopción de conductas y estilos de vida asociados con el desarrollo económico y la urbanización. Por ejemplo, el tabaquismo, la mala alimentación, la inactividad física y los patrones reproductivos.⁵ Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de la prevención y modificación de los factores de riesgo para el cáncer, así como la detección y diagnóstico temprano que permitan un tratamiento adecuado y eficaz.²

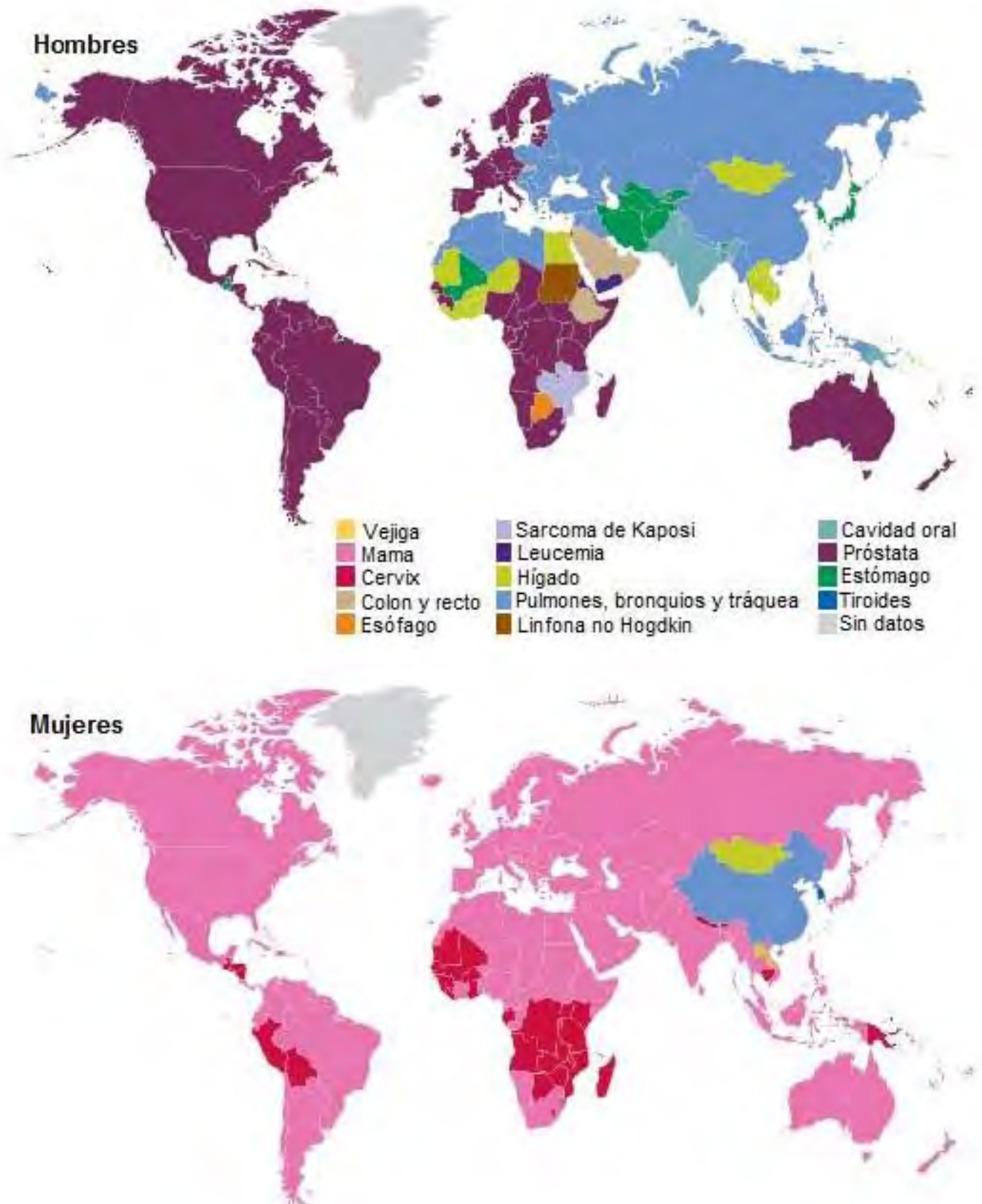


Figura 1. Distribución por género, de los diversos tipos de cáncer en el mundo ⁵

1.2 Medicamentos actuales contra el cáncer

Una vez que se confirma el diagnóstico de cáncer, se debe de determinar la etapa para evaluar las opciones de tratamiento y el pronóstico; el diagnóstico correcto es esencial para un tratamiento adecuado y eficaz. Los principales tratamientos del cáncer son la cirugía, la quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida (hormonal e inmune), que se pueden usar solos o en combinación con el objetivo de erradicar el cáncer, prolongar la vida del paciente de forma considerable y/o mejorar la calidad de vida.⁵ Estos tratamientos se describen brevemente en la Tabla 2:

Tabla 2. Principales tratamientos contra el cáncer⁶

Tipo de tratamiento	Descripción
Cirugía	Procedimiento en el que se extirpa la masa tumoral del cuerpo
Radioterapia	Tratamiento que usa altas dosis de radiación para destruir células cancerosas y reducir tumores
Quimioterapia	Tratamiento que usa fármacos para destruir células cancerosas
Inmunoterapia	Tratamiento que usa y ayuda al sistema inmunitario a combatir y eliminar las células cancerosas
Terapia dirigida	Tratamiento que actúa sobre los cambios que promueven el crecimiento, la división y diseminación de las células cancerosas
Terapia hormonal	Tratamiento que hace más lento o detiene el crecimiento principalmente de aquellos tipos de cáncer que usan hormonas como factor de crecimiento

La quimioterapia ha sido durante mucho tiempo el enfoque de elección para el tratamiento de los tumores que no son adecuados para la disección radical debido a una etapa avanzada. Sin embargo, algunos de estos tumores poseen la capacidad de resistir los efectos de los agentes quimioterapéuticos.⁷

La resistencia a agentes quimioterapéuticos puede ser dividida en dos categorías: intrínseca y adquirida. La primera indica la presencia de mediadores pre-existentes que conduce a la ineficacia hacia un tratamiento dado, mientras que la segunda representa la aparición de resistencia contra un régimen terapéutico inicialmente eficaz. La resistencia a la quimioterapia y a la terapia dirigida

representa un obstáculo para una respuesta clínica duradera. Ante esta situación, los futuros esfuerzos para el descubrimiento de nuevos fármacos anticancerígenos deben ser enfocados a rebasar esta problemática.⁷

2. Antecedentes

2.1 Desarrollo de fármacos

Desde el comienzo de su existencia, el ser humano ha buscado la cura de sus enfermedades en diversas fuentes: hierbas, frutas, raíces, corteza de árboles, etc. El nacimiento de la química farmacéutica, disciplina relacionada con el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos, se estableció a partir de los trabajos de Paul Ehrlich. Este introdujo los primeros conceptos para el desarrollo racional de fármacos, reconociendo que para el desarrollo de un fármaco es necesario e importante el conocimiento de sus efectos benéficos y tóxicos.

Así, buscando fármacos para tratar la sífilis, realizó un estudio con más de 600 compuestos que contenían arsénico en su estructura. Este trabajo sentó las bases de lo que hoy conocemos como estudios de relación estructura-actividad, esto es, la relación entre la presencia de un determinado átomo o grupo funcional en una molécula y el efecto que producen en una determinada actividad farmacológica.⁸

2.1.1 Identificación del objetivo biológico (molécula diana)

En la actualidad el descubrimiento de nuevos fármacos es un largo proceso que comienza con la identificación de la diana biológica. La diana biológica es, por ejemplo, alguna enzima que desempeña un papel fundamental en el proceso que lleva al desarrollo de una determinada enfermedad. De manera que, resulta atractivo encontrar una molécula que interaccione con esta enzima inhibiéndola y evitando su acción.⁹

2.1.2 Validación de la diana

La validación, es el proceso de establecer un efecto causal de la enfermedad, y el potencial terapéutico de una diana potencial. Por ejemplo, una proteína que es sobreexpresada en las células cancerosas, podría representar un diana molecular contra la tumorigénesis.⁹

La identificación y validación de dianas relevantes en la enfermedad es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos.

2.1.3 Generación de nuevos compuestos y selección del lead

Luego de establecida la diana biológica es necesario encontrar el denominado lead (compuesto prototipo), una molécula que tiene la actividad biológica deseada, sobre una diana molecular validada.⁸ Para esto, se desarrollan una serie de ensayos bioquímicos o celulares para monitorear la actividad de una serie de compuestos. Aquellas sustancias activas (leads) serán utilizadas como punto de partida para modificaciones químicas. Además del enfoque de detección, hay varias estrategias alternativas que se pueden utilizar para identificar compuestos lead, como el HTS (*high throughput screening*; un ensayo de un gran número de compuestos de origen sintético o natural, en un test biológico in vitro sobre una diana de potencial utilidad terapéutica).¹⁰ Y el diseño de fármacos asistido por computadora (DiFAC), que comúnmente, tiene 3 objetivos: 1) encontrar nuevos compuestos lead para su posterior optimización; 2) identificar compuestos selectivos; y 3) optimizar la actividad biológica de compuestos activos.¹⁰

2.1.4 Optimización del lead y pruebas preclínicas

Un punto de partida es a menudo un compuesto bioactivo, modificado químicamente para mejorar sus propiedades de actividad, farmacocinéticas o biológicas.⁹ La diferencia entre un buen ligando y un fármaco exitoso es que este último no sólo es potente contra la diana (como un buen ligando), sino que también presenta buena biodisponibilidad y baja toxicidad.¹⁰

Durante el proceso de optimización del lead, los químicos farmacéuticos tratan de mejorar las propiedades de solubilidad, lipofilia, permeabilidad a la membrana, estabilidad metabólica, mediante la introducción de pequeñas modificaciones estructurales para mejorar sus características de absorción, distribución, metabolismo y excreción; propiedades farmacocinéticas que describen la disposición de un compuesto dentro del organismo y la influencia de la actividad del compuesto como un fármaco. El proceso de optimización consiste en ciclos iterativos de diseño químico y evaluación biológica dirigida, a la elección de un fármaco candidato para el desarrollo preclínico.⁹

Las pruebas preclínicas, incluyen los estudios *in vitro* y en animales para demostrar la calidad, seguridad y eficacia del producto y cuyos resultados pudieran ser extrapolados a humanos.¹¹

2.1.5 Pruebas clínicas

El proceso de descubrimiento de fármacos continua con las pruebas clínicas, es decir la investigación en seres humanos dirigida a obtener información con respecto a las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, así como de su seguridad. del fármaco

Dependiendo de la naturaleza y fase de estudio, puede estar diseñada para valorar la seguridad de un fármaco, la eficacia para el tratamiento o prevención de trastornos específicos, su tolerabilidad y efectos secundarios. Las diversas fases de los estudios clínicos se muestran en la Tabla 3.¹²

Tabla 3. Características de las diversas fases de estudios clínicos¹²

Fase I Primera vez en seres humanos	Fase II Primera vez en pacientes	Fase III Estudio clínico multicéntrico	Fase IV Vigilancia después de la comercialización
10 a 100 participantes	50 a 500 participantes	Cientos a miles de participantes	Varios miles de participantes
Por lo común voluntarios sanos; en ocasiones pacientes con enfermedades	Sujetos que reciben el fármaco experimental	Sujetos que reciben el fármaco experimental	Pacientes en tratamiento con el fármaco aprobado

avanzadas o poco comunes			
Abierto	Asignación al azar, con grupo testigo (que puede ser un grupo testigo que recibe placebo); puede ser ciego o doble ciego	Asignación al azar, con grupo testigo (que puede ser un grupo testigo que recibe placebo); puede ser ciego o doble ciego	Abierto
Seguridad y tolerabilidad	Eficacia e intervalo de la dosis	Confirmación de la eficacia en una población más grande	Eventos adversos, apego terapéutico, interacciones medicamentosas
Meses a un año	Uno a dos años	Tres a cinco años	Sin duración fija
Tasa de éxito: 50%	Tasa de éxito: 30%	Tasa de éxito: 25% a 50%	-

Hoy en día, el descubrimiento y desarrollo de fármacos es un proceso largo y costoso. Se tarda una media de 12 años y cuesta alrededor de 800 millones de dólares.⁹ El desarrollo de fármacos es retratado comúnmente como un proceso lineal, progresando desde la diana molecular a los compuestos lead, que son altamente optimizados para desarrollar los candidatos preclínicos, y finalmente a los fármacos para la evaluación clínica (Figura 2).¹³

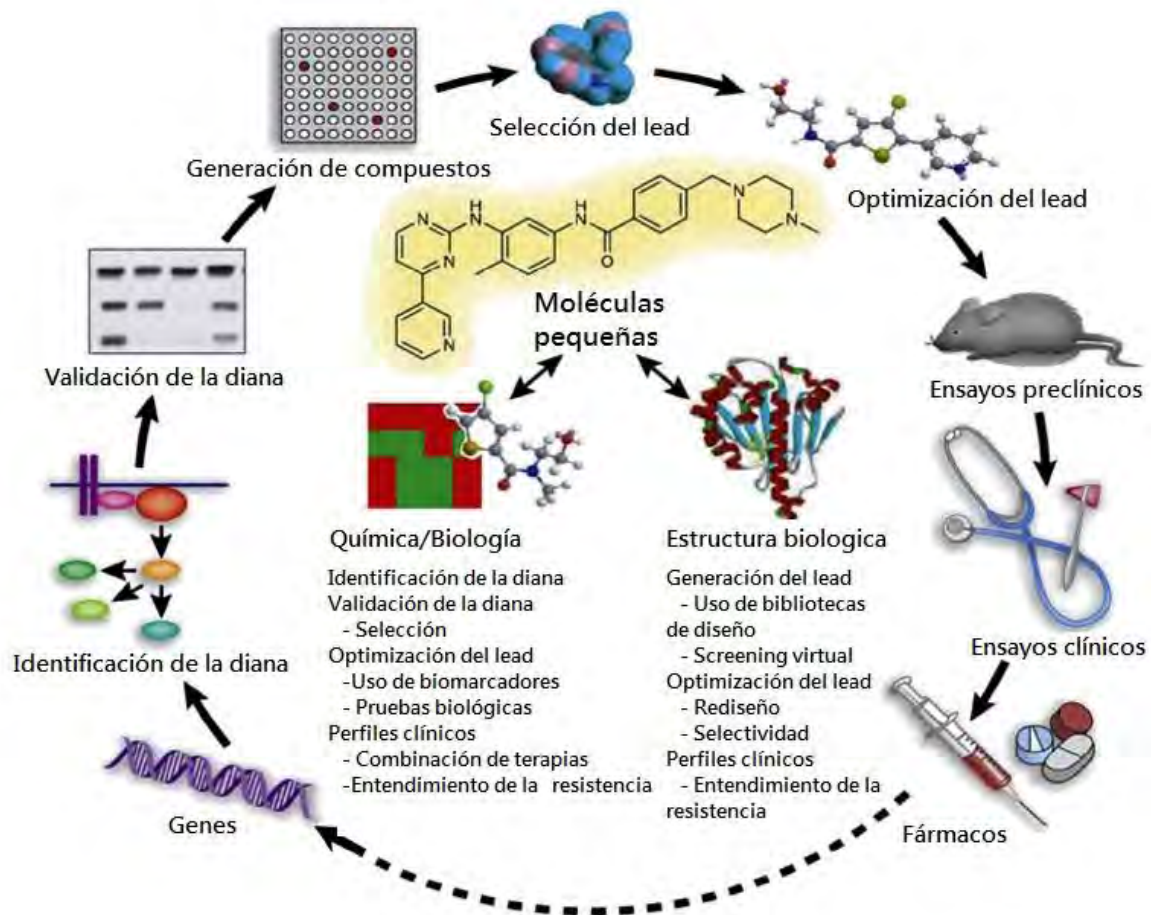


Figura 2. La forma integrada en que se produce el descubrimiento de fármacos consta de varias etapas sucesivas: (1) Identificación de la diana, (2) Validación de la diana, (3) Generación y selección de compuestos líder, (4) Optimización del lidera, (5) Pruebas preclínicas y (6) Pruebas clínicas.¹³

Sin embargo, el proceso de descubrimiento de fármacos es un ciclo iterativo entre el diseño compuesto, síntesis, evaluación biológica e interpretación. Cada ensayo proporciona retroalimentación para el diseño de nuevos compuestos dirigidos a mejorar las propiedades de los compuestos (Figura 3).¹³

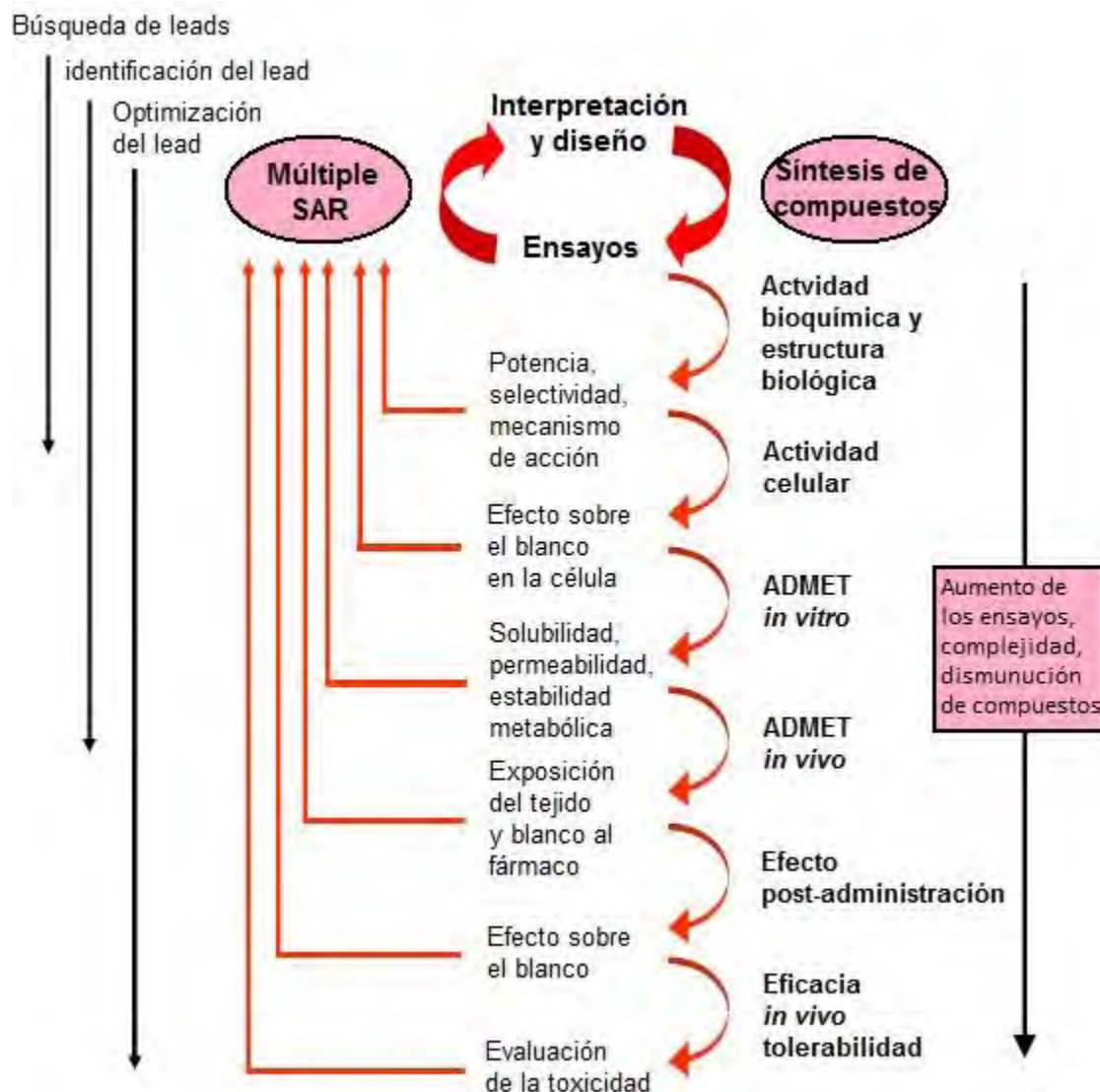


Figura 3. El descubrimiento de fármacos es una serie de ciclos iterativos vinculados a la retroalimentación del diseño, síntesis y evaluación de compuestos. A medida que el perfil biológico del compuesto se hace más sofisticado, la complejidad y el número de ensayos requeridos para la evaluación también aumentan.¹³

2.2 Desarrollo de antineoplásicos

La primera generación de fármacos contra el cáncer, originarios desde la década de 1950, eran casi todos agentes citotóxicos. Estos fármacos actúan dañando el ADN, inhibiendo su síntesis o interfiriendo con la división celular. La Tabla 4 muestra ejemplos de cada categoría⁹. Muchos de los cuales fueron

descubiertos por el escrutinio de compuestos de origen natural que fueron capaces de matar las células cancerosas, como el paclitaxel, un inhibidor de microtúbulos. Los agentes alquilantes de ADN, originalmente a base de mostazas nitrogenadas, fueron modificados estructuralmente a fin de controlar sus velocidades de reactividad química, lo que llevó a fármacos como la ciclofosfamida y la ifosfamida. Estos fármacos no fueron diseñados con base a la genética y biología molecular del cáncer sino con los principios de la química farmacéutica contemporánea, y en algunos casos, se trataba de la aplicación de las relaciones estructura-actividad y cristalografía de rayos X como únicas fuentes de información.

Tabla 4. Agentes quimioterapéuticos clasificados por su modo de acción⁹

Tipo de agente	Ejemplos	Modo de acción	Fase del ciclo celular afectada
Agentes modificadores del DNA			
Agentes alquilantes	Cloranbucil	Alquilación del ADN	Fase no específica
	Ciclofosfamida	Alquilación del ADN	Fase no específica
	Carbamustina	Alquilación del ADN	Fase no específica
	Lomustina	Alquilación del ADN	Fase no específica
	Dacarbazina	Alquilación del ADN	Fase no específica
	Temozolomida	Alquilación del ADN	Fase no específica
Complejos de platino	Cisplatino	Formación de aductos de ADN	Fase no específica
	Oxaliplatino	Formación de aductos de ADN	Fase no específica
	Carboplatino	Formación de aductos de ADN	Fase no específica
Anti-metabolitos			
	Metotrexato	Antagonista del ácido fólico	Fase S
	6-mercaptopurina	Inhibe la síntesis de nucleótidos	Fase S
	Fluorouracil	Inhibe la síntesis de ácidos nucleicos	Fase S
	Gemcitabina	Interfiere con la síntesis de ADN	Fase S
Venenos del huso			
Alcaloides de la Vinca	Vinblastina	Previene el ensamble de microtúbulos	Fase M
	Vincristina	Previene el ensamble de microtúbulos	Fase M
Taxanos	Paclitaxel	Previene el ensamble de microtúbulos	Fase M

	Cocetaxel	Previene el ensamble de micro túbulos	Fase M
Inhibidores de topoisomerasas			
Inhibidores de topoisomerasa I	Camptotecina	Causa roturas de la cadena/ Inhibe la replicación del ADN	Fase G2
Inhibidores de topoisomerasa I	Etoposido	Inhibe la replicación del ADN	Fase M
	Topotecan	Inhibe la replicación del ADN	Fase M
Antibióticos antitumorales			
	Bleomicina	Causa fragmentación del ADN	Fase G2
	Daunorrubicina	Se intercala con el ADN/ Inhibe la topoisomerasa II	Fase S
	Doxorrubicina	Se intercala con el ADN/ Inhibe la topoisomerasa II	Fase S

2.2.1 Desarrollo de nuevos antineoplásicos

Los avances en la comprensión molecular del cáncer que se han hecho durante las últimas tres décadas, ha transformado profundamente la forma de identificar y desarrollar medicamentos contra este padecimiento. Ahora, las dianas moleculares, reflejan la creciente comprensión de los cambios genéticos y epigenéticos que son responsables de la iniciación y progresión maligna del cáncer a través de la desregulación de la bioquímica celular y las redes de señalización.¹³ Se buscan agentes terapéuticos dirigidos que interactúen con una diana molecular específica para mediar sus efectos terapéuticos. Estas dianas moleculares se identifican y validan cuidadosamente. Su objetivo es contar con una macromolécula celular que esté implicada en la patogénesis de la enfermedad y en la que su modulación farmacológica tenga un efecto sobre el curso de la enfermedad. Hay cuatro tipos principales de macromoléculas: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos. Las proteínas son consideradas la mejor fuente de dianas para nuevos fármacos. Por otro lado, los agentes terapéuticos dirigidos molecularmente pueden ser moléculas pequeñas, anticuerpos y vacunas. Las

moléculas pequeñas se definen como moléculas por debajo de un peso molecular de 900 Da, que se difunden rápidamente a través de las membranas celulares y pueden llegar a dianas intracelulares, así como objetivos situados fuera de la célula. Por el contrario, los anticuerpos, no pueden atravesar las membranas celulares y actuar en el interior de una célula; ellos pueden inhibir la interacción de las moléculas de señalización y los receptores o desencadenar una respuesta inmune para destruir células cancerosas. Mientras que las vacunas normalmente contienen antígenos específicos que las células cancerosas sobre expresan.⁹

2.2.2 Importancia de la química farmacéutica

Una vez que una diana, por ejemplo, una proteína, ha sido identificada, el siguiente reto es descubrir moléculas que interaccionan con esta macromolécula. La química farmacéutica es la disciplina encargada de la síntesis de estas moléculas, que puede ser casi infinita; las limitaciones ocurren con base a la síntesis química y los efectos de ciertos grupos funcionales en el cuerpo humano. Varios fármacos se han producido de este modo; los químicos farmacéuticos realizan el trabajo de desarrollo del compuesto desde el principio, hasta el punto en el que el compuesto está listo para los ensayos clínicos.¹⁴

2.2.2.1 Diseño de fármacos

Existen varias estrategias que son utilizadas para la identificación de compuestos lead. Un punto de partida es a menudo un compuesto bioactivo interesante, que es modificado químicamente para mejorar sus propiedades de actividad, farmacocinéticas o biológicas. Por otro lado, una estrategia cada vez más importante en el descubrimiento moderno de fármacos es el diseño racional. El cual comienza con el diseño de compuestos que se ajustan a requisitos específicos, ya sea de la estructura 3D de la diana biológica (diseño de fármacos basado en la estructura) o de las estructuras de moléculas pequeñas activas ya conocidas (diseño de fármacos basado en ligando). Por

último, incluso el descubrimiento de fármacos modernos por serendipia sigue siendo importante.⁹

2.2.2.2 Diseño de *novo*

El diseño de fármacos de *novo* hace referencia a la producción de nuevos compuestos de manera virtual, que pueden no tener ninguna relación con moléculas ya producidas en el laboratorio. Lo que hace posible explorar de manera significativa millones de compuestos, que pueden ser "hechos" cada segundo. Con la ventaja de rechazar automáticamente, aquellos con grupos químicos que son conocidos por causar problemas en el desarrollo clínico, por ejemplo, toxicidad.¹⁴

2.2.2.3 Estudios SAR

Los estudios de relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés: structure–activity relationship) son centrales en la química farmacéutica; como el nombre lo indica, la estructura seleccionada tendrá una actividad particular que variará de una manera definida de acuerdo con el tipo de grupos químicos añadidos a la molécula de partida.¹⁵

2.2.2.4 Estudios QSAR

Los estudios de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR por sus siglas en inglés: quantitative structure–activity relationship), son una herramienta clave, que proporciona el análisis de compuestos virtuales, utilizando algoritmos informáticos: QSAR implica un análisis estadístico, utilizando los valores tales como el peso molecular y liposolubilidad, para predecir los grupos funcionales que tienen más probabilidades de mejorar la actividad biológica. Además de identificar los grupos con atributos positivos, QSAR se utiliza para eliminar los grupos potencialmente tóxicos.¹⁴

Una vez que se realizó la síntesis de las moléculas de estructura pequeña seleccionadas, por su potencia y selectividad demostrada mediante cualquiera

de las diversas herramientas de la química farmacéutica, éstas pasan a las pruebas de actividad biológica para confirmar o extender su perfil de actividad.

2.2.2 Pruebas de citotoxicidad

En las primeras etapas del descubrimiento de fármacos, la citotoxicidad *in vitro* es un indicador eficaz de la potencial toxicidad en humanos, que debe ser establecida con el fin de maximizar la probabilidad de progresar exitosamente en el desarrollo de compuestos. Es importante mencionar que los modelos de citotoxicidad están limitados por su incapacidad para predecir la posible toxicidad resultante de las interacciones entre los diferentes tipos de estructuras celulares y matrices extracelulares, tales como las que ocurren a nivel de tejido, órgano y sistema.¹⁶ En el caso de fármacos antitumorales, los ensayos de citotoxicidad son imprescindibles para cernir la especificidad y acción de estos sobre diferentes líneas celulares. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, pueden medir diferentes parámetros que intervienen en la progresión de la muerte y la proliferación celular. La mayoría de estos ensayos estiman las respuestas celulares a tres diferentes niveles:¹⁷

- 1) como la proliferación celular, la viabilidad, y la muerte
- 2) análisis de las vías de transducción de señal (por ejemplo, canales de iones y mensajeros secundarios)
- 3) en el nivel transcripcional/traduccional y el ADN (por ejemplo, proteínas, metabolitos celulares, y genes)

Existen un gran número de ensayos de citotoxicidad *in vitro*, diseñados y desarrollados para medir las respuestas celulares que van desde la muerte celular hasta una alteración temporal o reversible, en la estructura y función celular. Los puntos finales comunes que se miden para el análisis de la citotoxicidad son:¹⁷

- 1) Número de células
- 2) Viabilidad celular
- 3) Permeabilidad de membrana

- 4) Función metabólica celular
- 5) ATP celular
- 6) Calcio intracelular
- 7) Potencial de membrana mitocondrial y
- 8) Tamaño nuclear

Los ensayos más comunes para medir un determinado punto final se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Ensayos de citotoxicidad con base a varios criterios de valoración

Criterio de valoración	Ensayo de citotoxicidad
Número de células	Ensayo de tinción con azul de metileno, resazurina, sulfordamina B (SRB), azul tripano, Hoechst
Viabilidad celular	Ensayo de LDH, azul alamar, cristal violeta, calceína-AM, diacetato de fluoresceína, detección redox
Permeabilidad de membrana	LDH, MTT, anexina, ensayo basado en la granzima, o con base a la caspasa
Función metabólica celular	MTT, WST-1
ATP celular	Ensayo luminiscente basada en el ATP
Calcio intracelular	Fluo-3, Fluo-4
Proteína celular total	Ensayo de SRB
Tamaño nuclear	Homodímero de etidio, colorante de propidio, BrdU, DAPI, ensayo de TUNEL, Hoechst, ensayo basado en las caspasas
Actividad lisosomal	Rojo neutro, ensayo de actividad de la catepsina D, ensayo basado en la granzima
Glucosa	Análogo de la glucosa fluorescente

Finalmente, cabe destacar que la elección de un ensayo particular para el análisis de la citotoxicidad de una sustancia química dependerá de factores tales como: los modelos de cultivo celular *in vitro*, las plataformas de cultivo, el punto final a medir, métodos de evaluación o detección, mecanismo de la citotoxicidad y las propiedades fisicoquímicas del compuesto a evaluar.¹⁷

2.3 Usos de las quinazolininas

Los heterociclos que contienen nitrógeno están en muchos compuestos bioactivos. Entre éstos destaca el núcleo de la quinazolina (Figura 3), cuyos derivados presentan diversas propiedades farmacológicas tales como: antimicrobiana,¹⁸ anticonvulsiva,¹⁹ anticancerígena,²⁰ antimalárica,²¹ antihipertensiva,²² anti-inflamatoria,²³ antidiabética,¹⁸ antitumoral,²⁴ anti-colinesterasa.¹⁸ Algunos ejemplos representativos se muestran en la Figura 4.

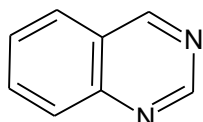


Figura 4. La estructura química de quinazolina.

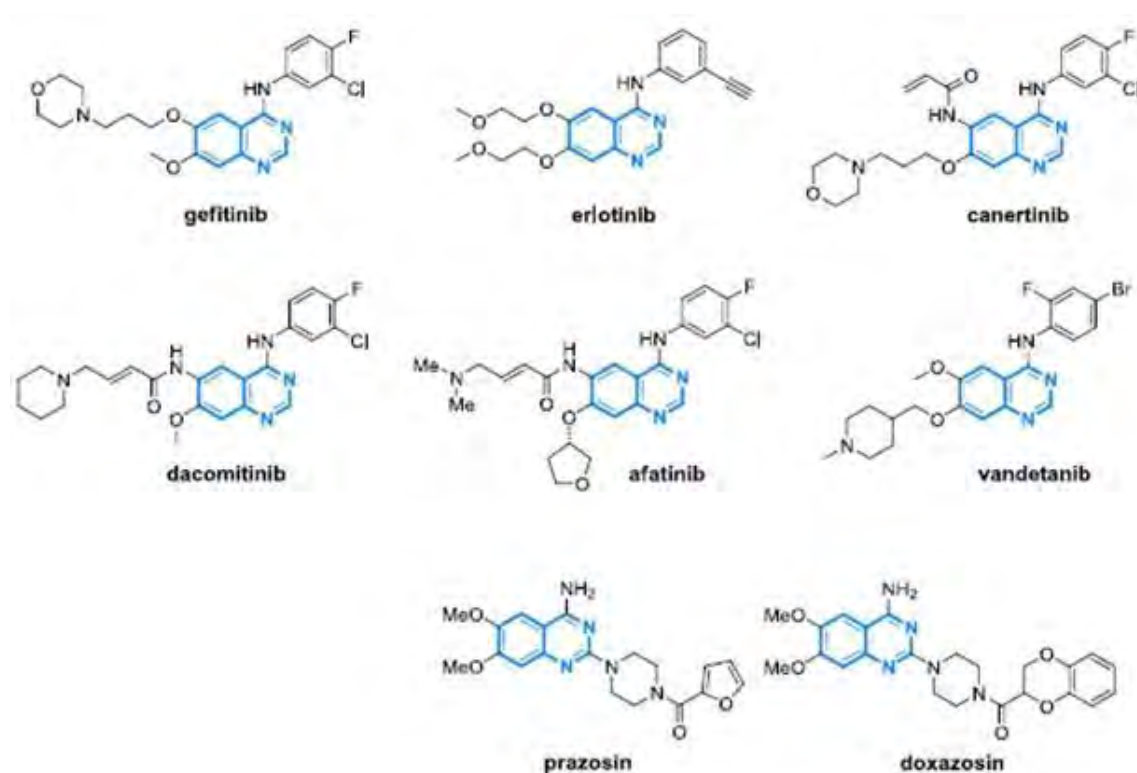


Figura 5. Estructuras de algunos fármacos comerciales y alcaloides que incorporan el núcleo de quinazolina.²⁵

2.3.1 Síntesis de nuevos derivados de quinazolina

Debido a las diversas propiedades farmacológicas de las quinazolininas, éstas han sido denominadas como estructura privilegiadas para la búsqueda de nuevos principios activos.²⁵ Una de sus dianas moleculares reportada ha sido la dihidrofolato reductasa (DHFR),²⁶ una enzima implicada en la producción de tetrahidrofolato (THF), cofactor esencial para la síntesis de metabolitos indispensables para las células (ADN, ARN y proteínas). La mayoría de las bacterias y plantas producen este cofactor por biosíntesis de *novo* a partir del ácido *p*-aminobenzoico (PABA), Figura 5. Mientras que en células de mamíferos como las del hombre, la producción de folatos depende de fuentes externas obtenidas de la dieta y posee vías alternas para reducir folatos, purinas y pirimidinas.²⁷ Hace varios años se emprendió la búsqueda de compuestos antifolatos, es decir que actúen inhibiendo la producción de ácido tetrahidrofólico, por ejemplo, mediante la inhibición de DHFR y por tanto mediante la inhibición de la producción de ADN, ARN y proteínas conduciendo a la muerte celular (Figura 5),²⁸ producto de este esfuerzo son los fármacos antibacterianos (Trimetoprim), antimaláricos (Pirimetamina) y antitumorales (Metotrexato).²⁷

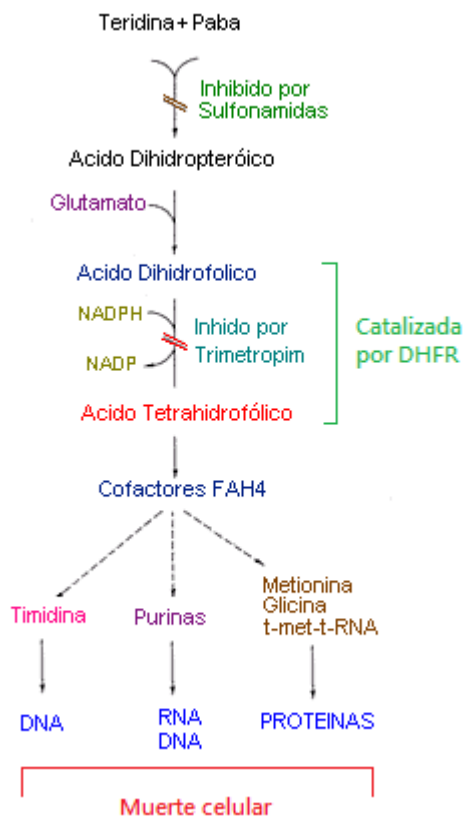


Figura 6. Funciones del tetrahidrofolato y la dihidrofolato reductasa en el metabolismo, se muestra que cuando DHFR es inhibida ocurrirá muerte celular.^{28,29}

Con el fin de encontrar nuevos fármacos contra enfermedades, se ha desarrollado y explorado la actividad de nuevos derivados de quinazolina. Un ejemplo de esto, es la búsqueda de moléculas bioactivas contra enfermedades que afectan a las regiones más pobres del mundo;³⁰ por ejemplo, la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*,³¹ leishmaniosis, causada por *Leishmania spp.*,³² y malaria, causada por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*.⁴ En este contexto, nuestro grupo de investigación sintetizó una serie de derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina (TAQ), Figura 6.^{21,30} Estos compuestos y sus resultados de actividad antiprotozoaria se presentan en las Tablas 6, 7 y 8, respectivamente.

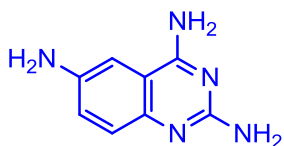


Figura 7. Quinazolin-2,4,6-triamina

Tabla 6. Nuevas quinazolinas con actividad biológica antiparasitaria^{21, 30}

Clave	Estructura	Peso molecular (g/mol)
H2		373.23
4		366.40
7		415.48
8		469.45
9		523.43

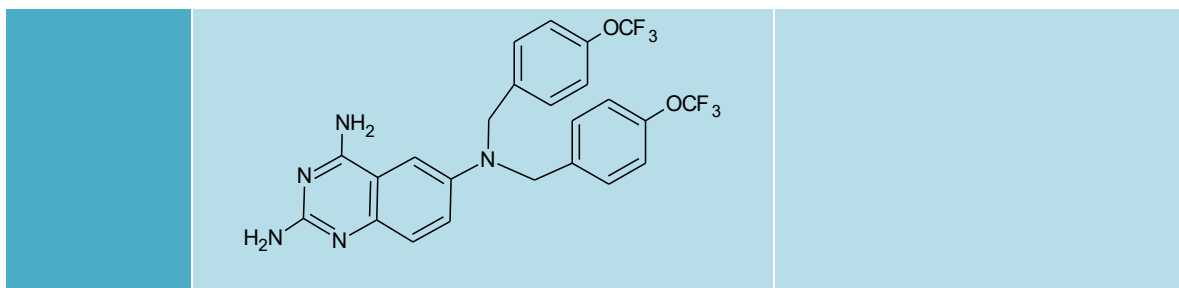


Tabla 7. Actividad *in vitro* contra tripomastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana* a 24 h^{21, 30}

Compuesto	Trypanosoma cruzi		Leishmania mexicana
	Cepa NINOA LC ₅₀ (μM) ± SD	Cepa INC-5 LC ₅₀ (μM) ± SD	Cepa MHOM/BZ/61/M379 LC ₅₀ (μM) ± SD
H2	Nd	Nd	0.93 ± 0.1
4	287.81 ± 16.54	183.67 ± 7.61	65.43 ± 6.45
7	62.64 ± 0.27	46.52 ± 4.53	23.10 ± 1.42
8	17.77 ± 0.79	40.67 ± 8.96	8.00 ± 0.89
9	35.01 ± 4.21	29.23 ± 6.34	4.93 ± 0.52
Glucantime	Nd	Nd	182.68 ± 0.19
Nfx	600 ± 18.92	310 ± 9.45	Nd
Bnz	780 ± 12.23	690 ± 6.78	Nd

Nfx: Nifurtimox, Bnz: Benznidazol y Glucantime; controles positivos. Nd: no determinado, LC: concentración lítica, SD: desviación estándar

Tabla 8. Actividad *in vivo* en un modelo murino con *Plasmodium berghei*³⁰

Compuesto	Supresión de la parasitemia (%)	El tiempo de supervivencia (Días después de la administración)
4	53.2	12 ± 4
7	0	7 ± 1
8	95.2	21 ± 1
9	21	14 ± 2
CQ	100	>23
Pir	100	>23
Control	0	0

CQ: Cloroquina, Pir: Pirimetamina; controles positivos. Los compuestos se aplicaron en 0-4 días después de la inoculación (pi) y se dosificaron por vía oral a una dosis de 50 mg/kg durante 4 días

Los datos mostraron que el compuesto **8** fue de los más activos en la reducción de la parasitemia y mostró casi la misma actividad que los controles positivos.

Mientras que los otros derivados de quinazolina (**4**, **7** y **9**) mostraron una actividad muy débil o inexistente.³⁰

Ya que esta serie de compuestos posee como farmacóforo a un núcleo de quinazolina (dada la diversidad en las respuestas biológicas y farmacológicas de las quinazolininas) y demostraron potente actividad biológica como antiparasitarios, resulta interesante seguir investigando más blancos moleculares y actividades biológicas para estas sustancias.

3. Justificación

El cáncer es uno de los grupos de enfermedades más extendidas en el mundo, prevaleciendo de manera indiscriminada sin importar región o grupo socioeconómico. Actualmente, los conocimientos sobre las bases moleculares del cáncer y su tratamiento han avanzado. Sin embargo, debido a su origen multifactorial, las células cancerígenas, pese a que comparten algunas características entre ellas, son muy diferentes debido a su origen embrionario y grado de diferenciación haciendo difícil erradicar la enfermedad. Asimismo, la resistencia a los agentes quimioterapéuticos conduce a la ineficacia de los tratamientos, por lo que el descubrimiento de nuevos fármacos es un enfoque prioritario.

En el presente trabajo se realizaron pruebas de citotoxicidad para determinar la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de una serie de nuevos derivados de quinazolina, en diferentes líneas celulares, así como pruebas para investigar su mecanismo de acción. Este trabajo es relevante para explorar la actividad antiproliferativa y el potencial como antitumorales o anticancerígenos, de una serie de nuevas moléculas que previamente fueron evaluadas en protozoarios, con el fin de conocer si su actividad se expande a células tumorales y posteriormente dar continuidad a más estudios dentro del campo de la quimioterapia, así como sintetizar moléculas más selectivas mediante su optimización.

4. Hipótesis

Si los derivados de la quinazolin-2,4,6-triamina previamente sintetizados por nuestro grupo de investigación, presentaron actividad citotóxica en protozoarios manifestarán el mismo comportamiento frente a líneas celulares tumorales por lo que podrán ser considerados agentes antiproliferativos.

5. Objetivo general

Determinar la concentración inhibitoria media de una serie de derivados de quinazolina, en diferentes líneas celulares malignas para establecer su perfil de acción antiproliferativa.

5.1 Objetivos particulares

- Determinar la IC_{50} de 5 derivados de quinazolina en las líneas celulares HeLa, MCF7, HCT-15 y PC-3
- Explorar si la actividad antiparasitaria de los compuestos evaluados se expande a líneas celulares malignas
- Explorar el mecanismo de acción de los compuestos evaluados como posibles agentes pro-oxidantes

6. Materiales y métodos

6.1 Materiales y reactivos

- Suero fetal bovino (SFB, de GIBCO)
- Medio de crecimiento y mantenimiento para HeLa y MCF-7: Medio EMEM (Eagle's minimum essential medium) suplementado con 10% (v/v) de SFB, de GIBCO
- Medio de crecimiento y mantenimiento para PC-3: Medio F12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium) suplementado con 10% (v/v) de SFB, de GIBCO
- Medio de crecimiento y mantenimiento para HCT-15: Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con 10% (v/v) de SFB, de GIBCO
- Tripsina-EDTA (0.25%), rojo de fenol, de GIBCO
- Placas de cultivo CORNING de 96 pozos
- Cajas para cultivo celular CORNING de 75 cm²
- Lector de placas Elisa
- Cámara de Neubauer
- Colorante azul tripano
- Solución de sulforrodamina-B al 0.4% en ácido acético al 1%
- Solución de Tris base 10 mM
- Solución de ácido acético al 1%
- Solución de ácido tricloroacético al 10%
- Agua estéril

6.2 Compuestos a evaluar

- Compuesto H2
- Compuesto 4
- Compuesto 7
- Compuesto 8
- Compuesto 9
- Cisplatino

6.3 Líneas celulares

Muchos estudios de seguridad y toxicidad de fármacos se realizan en cultivos celulares. Las líneas celulares se obtienen de tejidos transformados con ingeniería genética,³³ de manera que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación.³⁴ La creación de modelos de líneas celulares ha disminuido el

número de animales necesarios para los estudios (con la consiguiente reducción del costo y el tiempo) de manera que contribuyen a acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos.³³

6.3.1 HCT-15

La línea celular HCT-15 proviene de un adenocarcinoma colorectal en estadio C de Duke's ,de morfología epitelial, adherente (Figura 7), proveniente de un individuo de sexo masculino.³⁵

6.3.2 HeLa

Hela es una línea celular proveniente de un adenocarcinoma cervicouterino, de morfología epitelial, adherente (Figura 7), proveniente de un una mujer de 31 años de edad de raza negra.³⁶

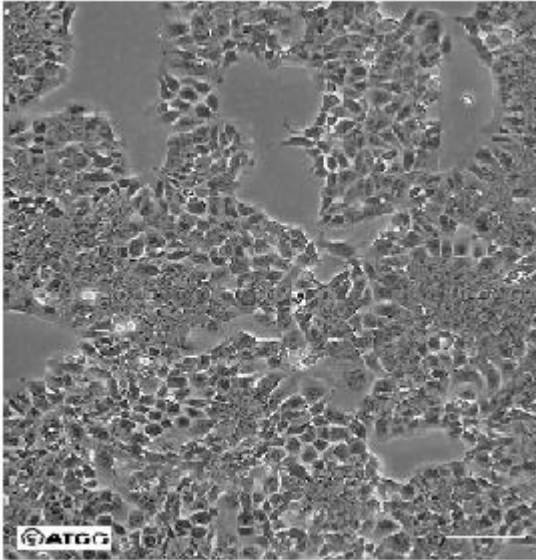
6.3.3 MCF7

La línea celular MCF7 que corresponde a un adenocarcinoma mamario, derivada del sitio metastásico; una efusión pleural. De morfología epitelial, adherente (Figura 7), proviene de una mujer de 69 años de edad.³⁷

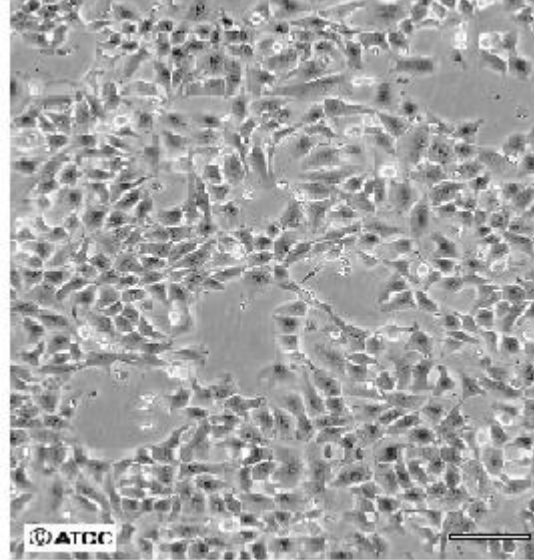
6.3.4 PC-3

PC-3 es una línea celular que corresponde a un adenocarcinoma prostático de grado IV, derivado del sitio metastásico; hueso. De morfología epitelial, adherente (Figura 7), proviene de un hombre caucásico de 62 años de edad.³⁸

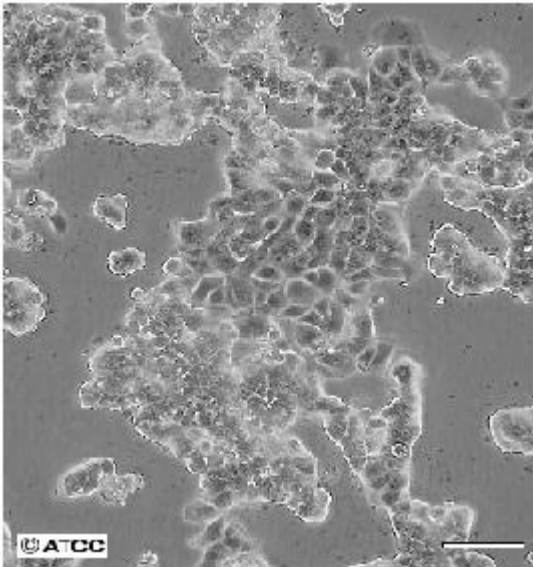
HCT-15



HeLa



MCF7



PC-3

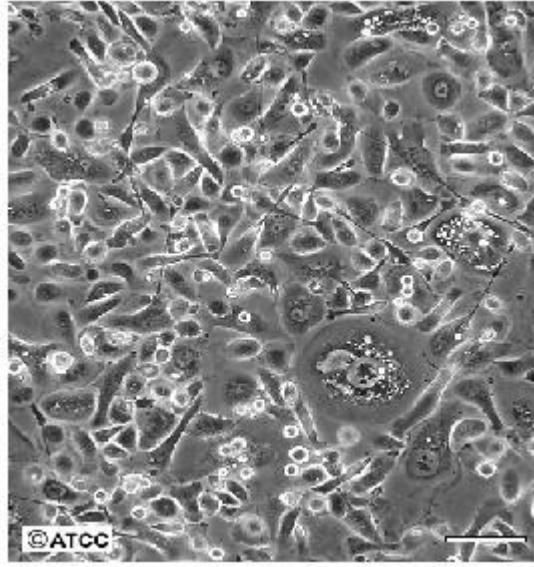


Figura 8. Morfología de las líneas celulares HCT-15, HeLa, MCF7 y PC-3 provenientes de la ATCC^{35, 36, 37, 38}

6.4 Cultivo celular

Las líneas celulares de mantuvieron en medio de cultivo de acuerdo a la Tabla 9, suplementado con 10% (v/v) de SFB, en frascos de cultivo celular de 75 cm², a 37°C, en atmosfera al 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa dentro de una

incubadora (Thermo). Con una densidad celular aproximada de 5×10^5 células/mL. Las células fueron resemebradas cada vez que la confluencia alcanzaba un 80%.

Tabla 9. Medios de cultivos utilizados para cada línea celular

Línea celular	Medio de cultivo
HCT-15	Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute)
HeLa	Medio EMEM (Eagle's minimum essential medium)
MCF7	Medio EMEM (Eagle's minimum essential medium)
PC-3	Medio F12K (Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium)

6.4.1 Descongelamiento de líneas celulares

Las líneas celulares se mantienen en ultracongelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en crioviales. Previo al procedimiento de descongelación, se extrae el criovial de la línea celular a descongelar y dentro de una campana de flujo laminar, se descongela lo más rápido posible. En condiciones asépticas se prepara un tubo Falcon de 10 mL, con 3 mL de medio de lavado F12. Se vierte la suspensión celular descongelada en el tubo Falcon, se centrifuga a 1500 rpm, durante 5 min. El sobrenadante se aspira y el botón se resuspende en 2 mL de medio de cultivo de acuerdo a la línea celular descongelada (ver Tabla 9). Posteriormente, en 2 frascos de cultivo de 75 cm^2 , se coloca 1 mL de suspensión celular y se adicionan 9 mL de medio de cultivo suplementado con SFB al 10% (v/v). Las cajas se colocan en incubación durante 24 h, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 95% de humedad relativa con el fin de favorecer la adhesión celular. Al término de dicho periodo, el medio se aspira y se colocan 10 mL de medio fresco. Finalmente, los frascos se colocan en incubación bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

6.4.2 Proliferación celular

Las cajas con células son dejadas en incubación y revisadas cada 24 h. El medio de cultivo es reemplazado por medio fresco cada 48 h hasta que se alcanza una confluencia entre el 80 y 90%, después se procede a la tripsinización.

6.4.3 Tripsinización

Las cajas de cultivo son retiradas de la incubación y bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar, se aspira el medio de cultivo. Se adicionan 2 mL de tripsina-EDTA 0.25%, se distribuye por la superficie de toda la caja y ésta se deja en incubación durante 3 minutos a 37°C hasta que se desprenda la monocapa celular. Transcurrido este tiempo la caja se saca de incubación y bajo condiciones asépticas se adicionan 3 mL de medio de lavado F12, las células se resuspenden y la suspensión se transfiere a un tubo Falcon de 10 mL. Se centrifuga a 1500 rpm, durante 5 min. El sobrenadante se aspira y el botón se resuspende en 2 mL de medio fresco suplementado con SFB al 10% (v/v).

6.4.4 Cuantificación celular

En un tubo de microcentrifuga se colocan 20 µL de la suspensión celular antes obtenida y 20 µL de colorante azul tripano. Esta mezcla se homogeniza y se toman 10 µL de ella, se colocan en una cámara de Neubauer, y, al microscopio con objetivo de 40X. Se cuenta el número de células no teñidas (células vivas). Finalmente, se calcula el número de células con la siguiente fórmula:

$$\text{No. de células} = \frac{\text{NCV} * 2 * 2 * 10,000}{4}$$

Dónde:

NCV: Número de células vivas contadas

2: Factor de dilución

2: Volumen de medio en el que fue resuspendido el botón celular

10,000: Factor de conversión de la cámara de Neubauer

4: Número de cuadros de 1 mm² contados en la cámara de Neubauer

6.5. Pruebas de citotoxicidad

6.5.1 Preparación de los compuestos a evaluar

Siguiendo el esquema marcado en la Figura 8, se prepararon 5 diluciones con las siguientes concentraciones: 2500, 1000, 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

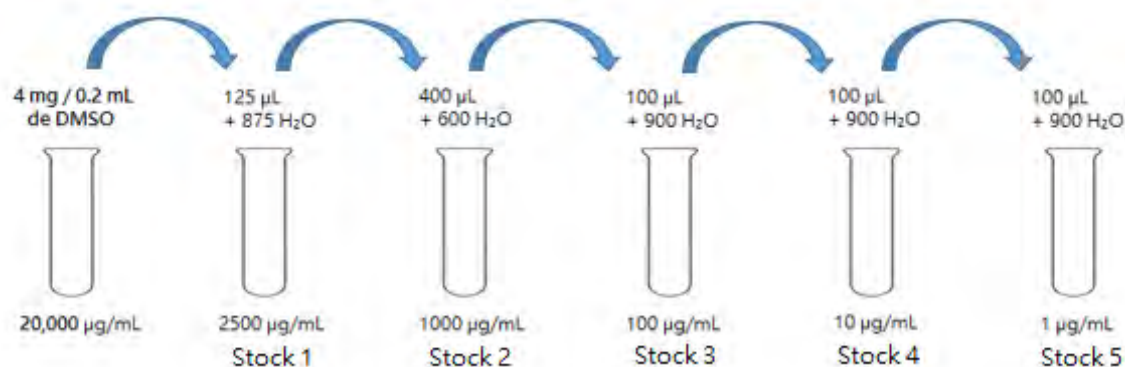
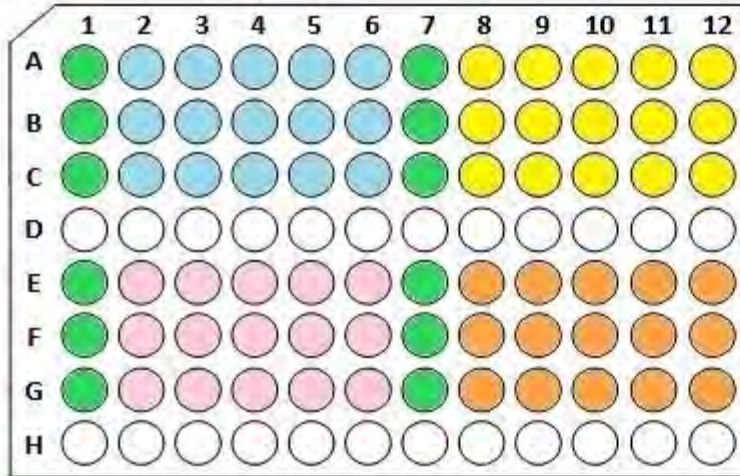


Figura 9. Obtención de las diluciones de los compuestos de prueba

6.5.2 Citotoxicidad

Con el objetivo de determinar la IC_{50} , se siguió la metodología de proliferación, tripsinización y cuantificación celular. Se preparó una suspensión celular con 200,000 cel/mL. Durante la prueba se aplicaron 100 μL en todos los pozos (20,000 cel/pozo, ver Figura 9), para cada línea celular. Las placas de Elisa se incubaron durante 24 h (37°C , 5% de CO_2 , y 95% de humedad relativa) para favorecer la adhesión celular en su superficie. Transcurrido este lapso, se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y se reemplazó con medio fresco (100 μL para controles y 90 μL para pozos de prueba). Después se aplicó el compuesto de prueba (10 $\mu\text{L}/\text{pozo}$) de acuerdo a la Figura 9, exceptuando al control.

Placa 1



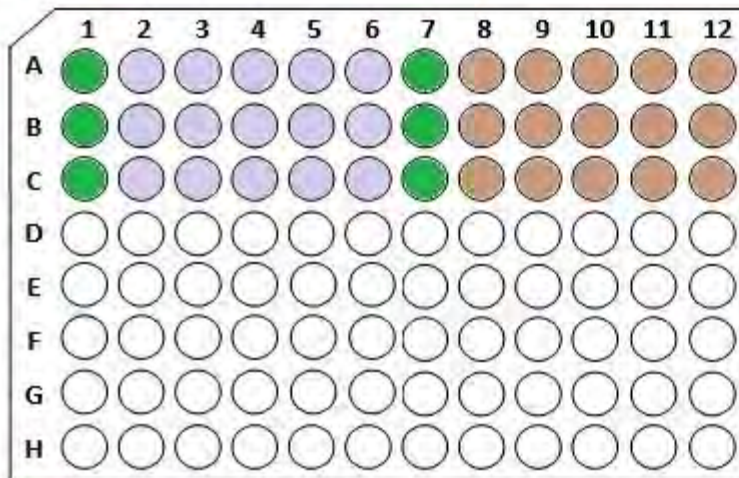
Cada pozo contenía:

Controles: 100 μ L de medio fresco

Pozos de prueba: 90 μ L de medio fresco + 10 μ L de dilución del compuesto

■ Control ■ Compuesto H2 ■ Compuesto 4 ■ Compuesto 7 ■ Compuesto 8

Placa 2



■ Control ■ Compuesto 9 ■ Cisplatino

Figura 10. Placas de 96 pozos, mostrando la aplicación de las disoluciones de los compuestos a evaluar; fueron aplicadas de izquierda a derecha después del control, de manera decreciente en concentración (2500, 1000, 100, 10 y 1 μ g/mL). Esto fue realizado para cada línea celular, por triplicado.

Posteriormente las placas se incubaron durante 24 h, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Al término de la incubación, se aspira el medio de cultivo y se fijaron las células con 100 µL de ácido tricloroacético al 10%, durante 1 h a 4°C. Posterior a esto se lavaron con 100 µL de agua destilada, 5 veces y se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.5.1 Tinción con sulforrodamina-B y lectura de placas

Una vez seca la placa, se adicionaron 50 µL de solución de SRB al 0.4% en ácido acético al 1% a cada uno de los pozos. Se incubó 30 min a temperatura ambiente y transcurrido este lapso el colorante fue lavado con 100 µL de ácido acético al 1%, 5 veces y se dejaron secar las placas de igual manera a temperatura ambiente. Después se solubilizó el colorante adicionando 100 µL de Tris base 10 mM, con agitación durante 5 min hasta observar la solubilización homogénea. Posteriormente se procedió a la lectura del ensayo, con un lector de microplacas a una longitud de onda de 564 nm. El porcentaje de proliferación se determinó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Proliferación} = \frac{\text{ACP} \times 100}{\text{ACC}} \quad \text{dónde:}$$

ACP: Absorbencia del compuesto de prueba

ACC: Absorbencia del control, considerado el 100% de proliferación

El porcentaje de proliferación para cada concentración, dada por las diluciones de cada compuesto, fue calculado obteniendo el promedio entre las 3 repeticiones realizadas.

6.6 Prueba para la exploración del mecanismo de acción de los compuestos

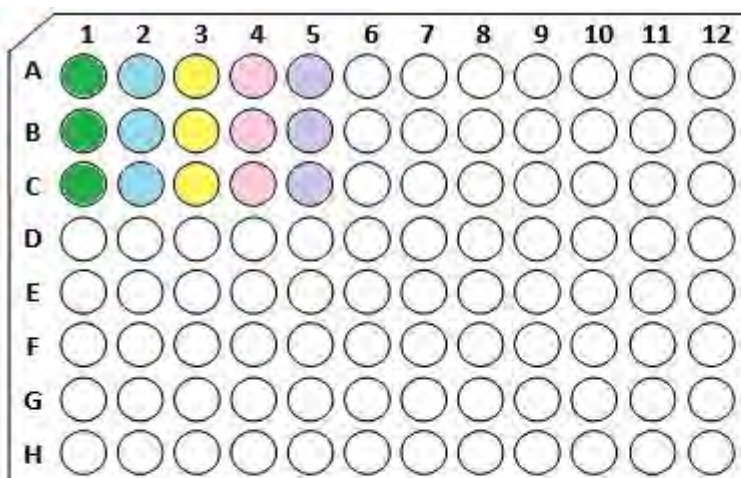
Especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) están implicados en efectos de la radiación y quimioterapia, mutagénesis y carcinogénesis.³⁹ Para explorar si durante el proceso de inhibición celular estaban involucradas ROS, una vez obtenidas las IC₅₀ de cada compuesto, estas se probaron en presencia de un

antioxidante (*N*-acetilcisteína). Para lo cual se siguió la metodología de proliferación, tripsinización y cuantificación celular. Se preparó una suspensión celular con 200,000 cel/mL. Durante la prueba se aplicaron 100 μ L en todos los pozos (20,000 cel/pozo, ver figura 10), para cada línea celular. Las placas de Elisa se incubaron durante 18 h (37°C, 5% de CO₂, y 95% de humedad relativa) para favorecer la adhesión celular en su superficie. Transcurrido este lapso, se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y se reemplazó con medio fresco (100 μ L para los controles, 90 μ L para los pozos de IC₅₀, pre y post tratamiento, y, 80 μ L para los pozos de tratamiento simultáneo)

Después se aplicaron los tratamientos de la siguiente forma, ver también Figura 10.

- IC₅₀ teórica (10 μ L) de los compuestos en cada línea celular, durante 24 h.
- En un pre-tratamiento de 4 h con *N*-acetilcisteína 5 mM (10 μ L/pozo). Después de este tiempo el medio fue aspirado, se adicionaron 90 μ L de medio fresco y 10 μ L del compuesto de prueba (IC₅₀), durante 24 h.
- En un tratamiento simultáneo con la IC₅₀ del compuesto de prueba (10 μ L/pozo) y *N*-acetilcisteína (10 μ L/pozo), durante de 24 h.
- En un post tratamiento, inicialmente se adicionaron 10 μ L del compuesto de prueba (IC₅₀), durante 24 h. Al final de este lapso se aspiró el medio, se adicionaron 90 μ L de medio fresco y 10 μ L de *N*-acetilcisteína 5 mM, durante 4 h.

Durante los tratamientos las placas fueron incubadas durante 24 h, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa. Al término de la incubación, se aspiró el medio de cultivo y se fijaron las células con 100 μ L de ácido tricloroacético al 10%, durante 1 h a 4°C. Posterior a esto, se lavaron con 100 μ L de agua destilada, 5 veces, se dejaron secar a temperatura ambiente y se realizó una tinción con SRB con el procedimiento previamente descrito.



Este procedimiento se realizó para cada compuesto evaluado con las 4 líneas celulares utilizadas

- Control
- IC₅₀, 24 hrs
- Pre-tratamiento con N-acetilcisteína, 4 hrs
- Tratamiento simultáneo con N-acetilcisteína y compuesto de prueba, 24 hrs
- Post-tratamiento con N-acetilcisteína, 4 hrs

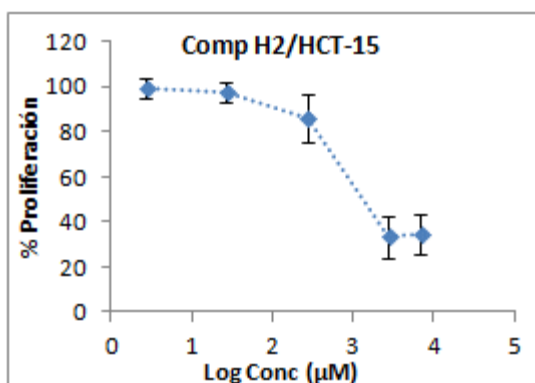
Figura 11. Placa Elisa, mostrando la prueba para la exploración del mecanismo de acción de uno de los 5 compuestos evaluados.

7. Resultados y discusión

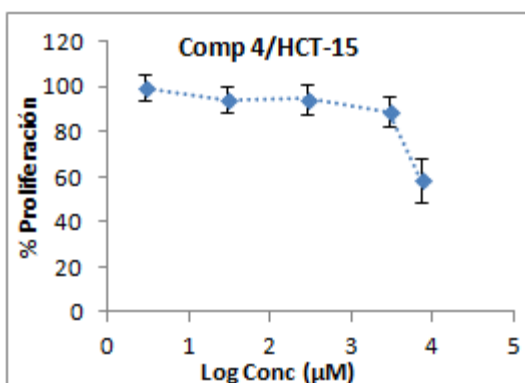
7.1 Pruebas de citotoxicidad

Las pruebas de citotoxicidad tuvieron como fin, evaluar el efecto sobre la proliferación de los compuestos de prueba sobre las líneas celulares HCT-15, HeLa, MCF7 y PC-3, mediante el cálculo de las IC₅₀ de cada compuesto. Ésta fue calculada mediante el software SPSS Ver. 22, utilizando el análisis de regresión Probit con un 95% de límites de confianza. El control positivo usado fue el cisplatino. Para poder comparar los resultados entre cada compuesto, la concentración de las diluciones fue cambiada de µg/mL a µM. En la Figura 11 se muestran las gráficas de actividad para la línea celular HCT-15 con los compuestos de prueba. Mientras que en la Figura 12, se muestran las gráficas de actividad de los controles positivos sobre la misma línea celular. En el

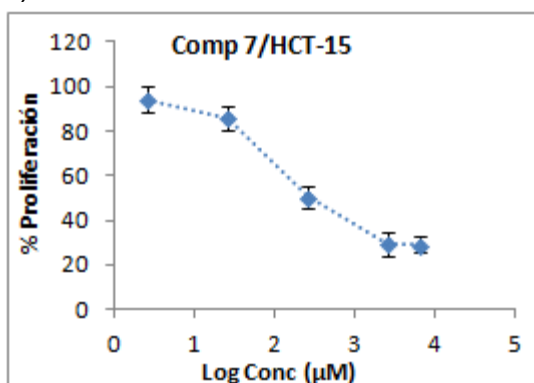
apéndice se muestran las gráficas de la actividad de los compuestos evaluados sobre las líneas celulares restantes.



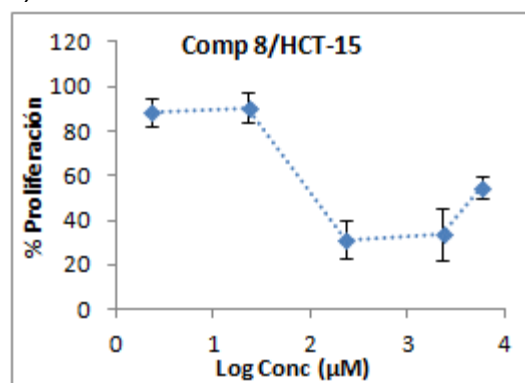
a)



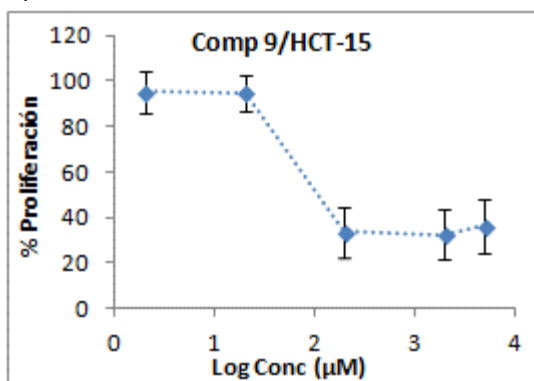
b)



c)

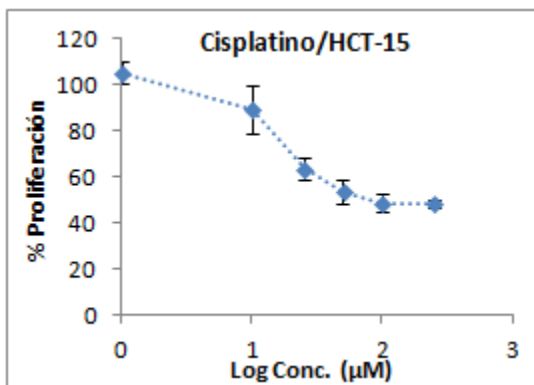


d)



e)

Figura 12. Efecto sobre la proliferación celular de los compuestos: a) H2, b) 4, c) 7, d) 8 y e) 9, en la línea celular HCT-15, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



a)

Figura 13. Efecto sobre la proliferación celular del control positivo: a) Cisplatino sobre la línea celular HCT-15, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación

Mediante los datos obtenidos en las pruebas *in vitro*, se determinó la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de la proliferación para las 4 líneas celulares empleadas. Los datos mostrados corresponden a los compuestos evaluados con línea celular (Tabla 10).

Tabla 10. IC_{50} (μM) de los 5 compuestos evaluados en las líneas celulares HCT-15, HeLa, MCF7 y PC-3, obtenidas mediante la técnica de SRB

Compuesto	Línea Celular	Límite inferior	IC_{50} (μM)	Límite Superior
H2	HCT15	161.96	265.65	443.61
	Hela	61.17	97.13	155.03
	MCF7	48.01	70.95	105.00
	PC3	197.49	323.74	541.19
4	HCT15	1731.08	3188.11	6125.43
	Hela	59.32	93.33	147.86
	MCF7	140.73	209.45	314.31
	PC3	737.81	1275.90	2276.58
7	HCT15	34.56	54.80	87.34
	Hela	23.51	37.04	58.28
	MCF7	48.99	71.83	105.64
	PC3	114.52	184.42	301.37

8	HCT15	38.31	60.15	95.13
	Hela	9.70	14.88	23.09
	MCF7	26.10	37.77	54.71
	PC3	56.68	89.17	141.46
9	HCT15	27.80	43.99	69.97
	Hela	13.73	21.46	33.49
	MCF7	22.02	32.22	47.14
	PC3	96.29	154.87	253.22
Cisplatino	HCT15	32.36	48.94	75.44
	Hela	6.61	9.57	13.86
	MCF7	39.28	54.99	77.89
	PC3	123.76	188.14	294.78

A continuación, únicamente con fines comparativos, en la Tabla 11, se contrastan los valores de la IC₅₀ (µM) del cisplatino obtenidos experimentalmente, con otros valores ya reportados (valores para 24 h de exposición al cisplatino, HeLa, HCT-15 y PC-3 evaluados mediante MTT,^{40, 41, 42} MCF7 evaluada mediante SRB⁴³).

Tabla 11. IC₅₀ del cisplatino, valores experimentales y reportados^{40, 41, 42, 43}

Línea celular	Hela	HCT-15	MCF7	PC-3
IC ₅₀ cisplatino experimental	9.57	48.94	54.99	188.76
IC ₅₀ cisplatino reportada	9.4	29.5	40.33	136

7.2 Prueba para la exploración del mecanismo de acción de los compuestos

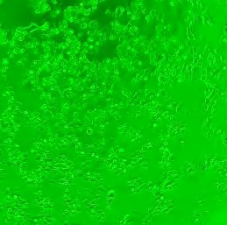
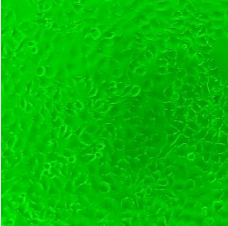
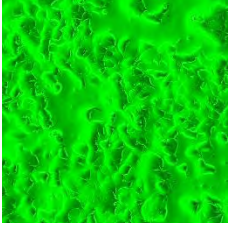

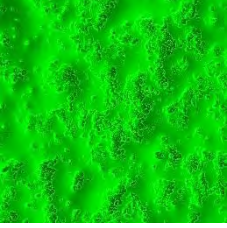
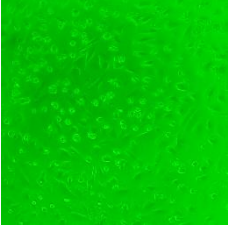
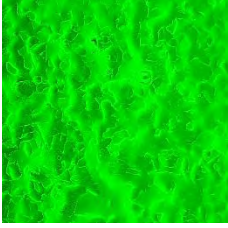
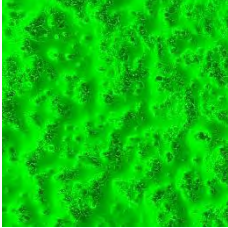
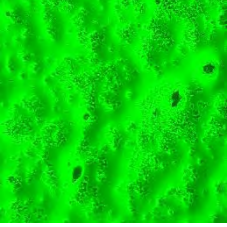
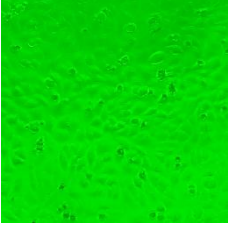
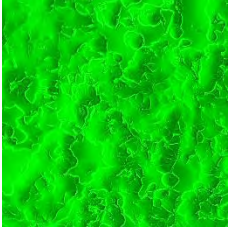

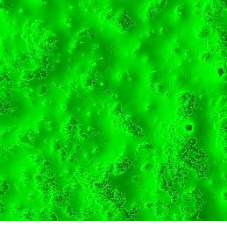
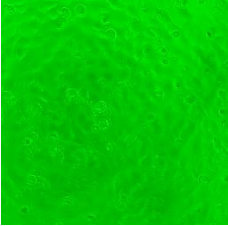
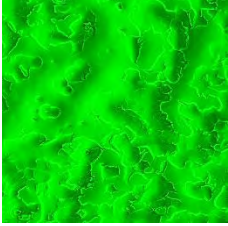
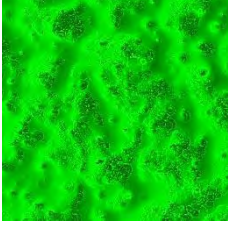


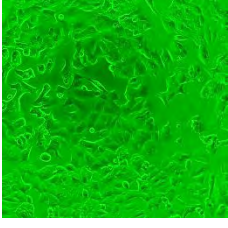

Este estudio fue diseñado para examinar la protección de un antioxidante durante su pre, post y tratamiento simultáneo.⁴⁴ Se probaron las IC₅₀ estimadas y, en presencia de *N*-acetilcisteína, en diversos tratamientos, previamente descritos en la metodología. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 12. Dado que el compuesto **9**, fue el que presentó el mejor perfil de actividad para las 4 líneas celulares en las que fue probado, en

la Tabla 13 se muestran imágenes de los resultados de esta prueba para este compuesto.

Tabla 12. Porcentaje de proliferación en ausencia y en presencia de *N*-acetilcisteína (pre-tratamiento, tratamiento simultáneo y post-tratamiento)

% Proliferación					
H2	Línea celular	IC ₅₀	Pre-tratamiento	Tratamiento simultáneo	Post-tratamiento
	HCT-15	31.8	30.7	24.0	19.3
	Hela	71.60	79.2	67.2	79.0
	MCF7	61.0	61.7	61.5	62.2
	PC-3	32.2	29.6	22.4	18.3
% Proliferación					
4	Línea celular	IC ₅₀	Pre-tratamiento	Tratamiento simultáneo	Post-tratamiento
	HCT-15	Nd	Nd	Nd	Nd
	Hela	72.8	72.8	70.7	75.3
	MCF7	60.6	60.2	78.6	44.5
	PC-3	28.8	25.6	48.1	16.1
% Proliferación					
7	Línea celular	IC ₅₀	Pre-tratamiento	Tratamiento simultáneo	Post-tratamiento
	HCT-15	45.4	41.0	44.7	33.8
	Hela	57.2	51.3	54.2	54.0
	MCF7	30.0	25.0	29.0	17.9
	PC-3	22.6	22.2	22.1	16.6
% Proliferación					
8	Línea celular	IC ₅₀	Pre-tratamiento	Tratamiento simultáneo	Post-tratamiento
	HCT-15	30.8	26.0	31.5	18.4
	Hela	73.2	79.9	72.6	67.9
	MCF7	54.7	68.5	63.9	60.8
	PC-3	24.5	25.7	27.6	17.2
% Proliferación					
9	Línea celular	IC ₅₀	Pre-tratamiento	Tratamiento simultáneo	Post-tratamiento
	HCT-15	27.5	25.1	27.1	19.9
	Hela	60.8	59.6	57.2	61.6
	MCF7	40.2	36.1	56.0	34.0
	PC-3	63.0	61.7	56.0	48.3

Tabla 13. Micrografías de la prueba con el tratamiento con N-acetilcisteína del compuesto 9

Comp.9	HCT-15	HeLa	MCF7	PC-3
Control				
IC₅₀				
Pre-tratamiento				
Tratamiento simultaneo				
Post-tratamiento				

8. Discusión de resultados

La actividad biológica *in vitro*, de los derivados de quinazolina **H2**, **4**, **7**, **8** y **9** se probó en las líneas celulares HCT-15, HeLa, MCF7 y PC-3. Su actividad está expresada en IC₅₀ (Tabla 10). Este parámetro se calculó después de 24 h

de la exposición. El cisplatino fue usado como control positivo. Como se puede apreciar en la Tabla 10, varios compuestos resultaron más activos o equipotentes que el cisplatino. Este es el caso del compuesto **7**, en PC-3, con IC₅₀ de 184.42 μM (cisplatino 188.14 μM), el compuesto **8**, en MCF7 y PC-3, con IC₅₀ de 37.77 y 89.17 μM, respectivamente (cisplatino 54.99 y 188.14 μM, respectivamente), y el compuesto **9**, en HCT-15, MCF7 y PC-3, con IC₅₀ de 43.99, 32.22 y 154.87 μM, respectivamente (cisplatino 48.94, 54.99 y 188.14 μM, respectivamente). Es interesante contrastar, que los compuestos evaluados previamente habían sido probados como tripanocidas, antileishmaniásicos y antimaláricos, y entre ellos, los que presentaron mayor actividad fueron el **H2** (IC₅₀=0.93 μM, probado promastigotes de *Leishmania mexicana* a 24 h), el **9**, **8**, y, con moderada actividad **7** y **4** contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*, mientras que contra *Plasmodium berghei* el compuesto **8** fue el más activo (Tablas 7 y 8). Por el contrario, en las líneas celulares en las que fue evaluado el compuesto **H2**, no demostró gran potencia como antitumoral (Tabla 10).

Dado que en estudios posteriores,³⁰ se llegó a la conjetura de que su mecanismo de acción es producido parcialmente a través la inhibición de DHFR, así como por un mecanismo rédox,³⁰ se puede asumir que dicho compuesto presenta cierta selectividad hacia la DHFR de protozoarios, pues aunque dicha enzima está presente en mamíferos, protozoarios, bacterias y hongos, su estructura es diferente en los distintos organismos, por lo que presenta distinta sensibilidad a sus respectivos inhibidores.⁴⁵ Como se mencionó previamente dentro de los compuestos evaluados, sobresale la actividad biológica de **8** y **9** al obtener IC₅₀ inferiores al compuesto control; de manera similar a los resultados anteriormente obtenidos en parásitos. Estos compuestos guardan semejanza en su estructura en los átomos de flúor, estos probablemente les podrían haber conferido mayor actividad biológica debido a que aumentan la lipofilia de las moléculas, lo que modifica su absorción. En cuanto al compuesto **4**, en la Tabla 10 podemos observar que este fue el menos activo, lo cual posiblemente se debe al tamaño del sustituyente en el

anillo de benceno en la posición 6. Y ya que este sustituyente puede no tener un efecto electrónico en el núcleo de quinazolina, se asume que la disminución de la actividad se debe a sus dimensiones. De manera global, la potencia de los compuestos, en las 4 líneas celulares, es de la siguiente forma **9>8>7>H2>4**.

Se exploró el mecanismo de acción de los compuestos evaluados mediante la adición de un antioxidante dado que las especies reactivas, que incluyen principalmente especies reactivas del oxígeno (ROS), inducen un estado de estrés oxidante, caracterizado por efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis.⁴⁶ De manera que un pro-oxidante, generará muerte celular mediante este mecanismo, mientras que un antioxidante ejercerá un efecto protector y evitará los daños causados por las ROS; al captarlos, previniendo así daños a la célula. En la Tabla 12, podemos ver en el compuesto **8** (uno de los más activos), la proliferación celular tiende a aumentar en la mayor parte de los pre-tratamientos con *N*-acetilcisteína, de manera que muy probablemente los efectos citotóxicos de este compuesto se deban a que actúa como pro-oxidante y su actividad citotóxica es atenuada. Los efectos protectores de la NAC se deben a que esta es el precursor acetilado de uno de los aminoácidos de glutatión (GSH). Diversos estudios con animales y humanos con NAC han demostrado que es un potente antioxidante, que actúa mediante la reducción de cistina extracelular a cisteína, o actuando intracelularmente como una fuente de grupos sulfhidrilo (-SH) que sirve como donador de electrones y es responsable de la actividad biológica del glutatión.⁴⁴ Por lo tanto, NAC estimula la síntesis de GSH, mejora la actividad de la glutatión-S-transferasa y es un poderoso nucleófilo capaz de eliminar especies electrofílicas. Por el contrario del pretratamiento del compuesto **8**, en el post-tratamiento, así como en el pre y post tratamiento del compuesto **9** y **7**, no se observó un efecto protector inducido por la NAC. Incluso, la proliferación celular en estos casos disminuyó, por lo que podemos atribuir este aumento en la citotoxicidad a que la NAC

actuó para favorecer la actividad citotóxica, tal vez como pro-oxidante como ha sido reportado en algunos casos de daño hepático y renal causado por post-tratamientos con esta sustancia,⁴⁴ en tanto que pretratamientos con NAC han sido eficaces en la reducción del daño renal agudo mientras que el post-tratamiento los agravó.⁴⁴ En cuanto al mecanismo de acción de la molécula **H2**, ésta posee en su estructura una unidad de ferroceno, por lo que la química rédox entre Fe^{+2}/Fe^{+3} puede contribuir a la bioactividad de este compuesto sumado a la inhibición de la DHFR. Finalmente, además de los compuestos con mayor potencia en su actividad biológica (anteriormente mencionados), cabe destacar que, la actividad de **H2** en la línea celular MCF7; **7** en las líneas celulares HCT-15, HeLa y MCF7; **8** en las líneas celulares HCT-15 y HeLa; y, **9** en la línea celular HeLa. Presentaron una IC_{50} , que, si bien no igualó, o fue inferior al del control positivo, fue muy cercano a dicho valor, lo que convierte a estos compuestos también en buenos candidatos para seguir siendo estudiados y ser sometidos a modificaciones para mejorar sus perfiles de actividad biológica.

9. Conclusiones

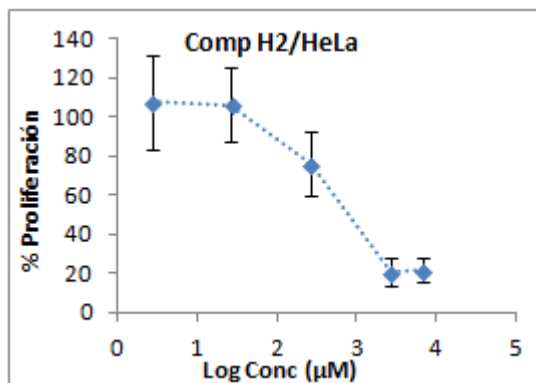
La evaluación *in vitro* de nuevos compuestos es imprescindible en el proceso de búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. En este proyecto se logró determinar la IC_{50} de 5 nuevos derivados de quinazolina, mediante la técnica de SRB.

La actividad de los compuestos evaluados, que anteriormente fue evaluada en parásitos, se expande a líneas celulares, aunque no con la misma potencia. Los compuestos con mejor actividad citotóxica son el **8** y **9**, en las líneas celulares MCF7 y PC-3, y, HCT-15, MCF7 y PC-3, respectivamente. Por lo que estos son los mejores candidatos a optimizar con potencial antitumoral. El compuesto **H2** constituye al mejor candidato como antiparasitario, pues su actividad en líneas celulares no fue destacada.

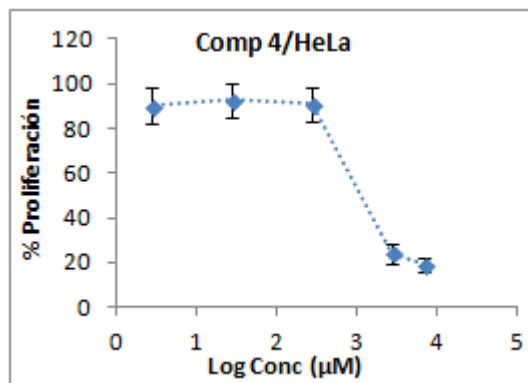
El compuesto **8**, muy probablemente, actúa como pro-oxidante induciendo así muerte celular, mientras que el mecanismo de acción de los compuestos restantes no ha sido esclarecido aún de manera certera, haciendo así conveniente ampliar los estudios para elucidarlo.

Los aportes de este trabajo de investigación servirán para guiar el desarrollo y posterior modificación de nuevas moléculas, de acuerdo a la actividad biológica deseada.

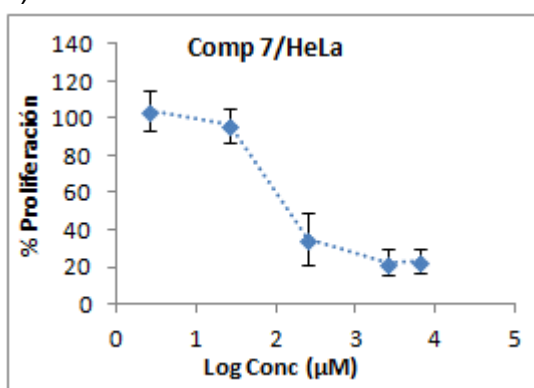
10. Apéndice



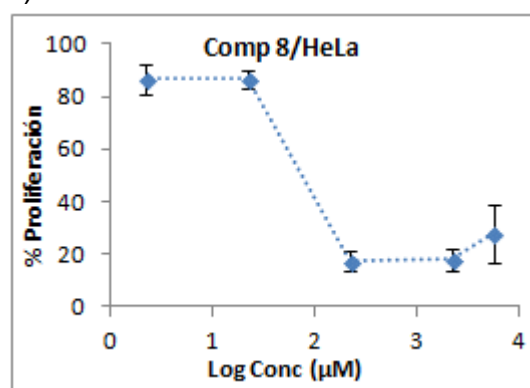
a)



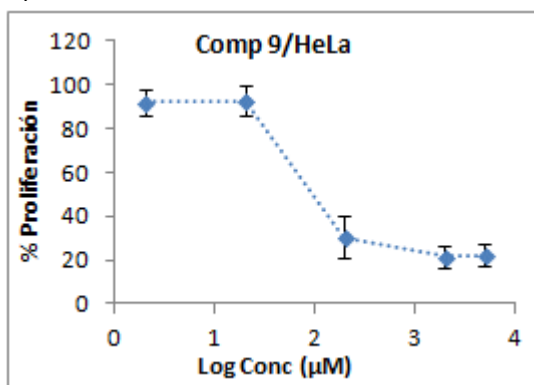
b)



c)

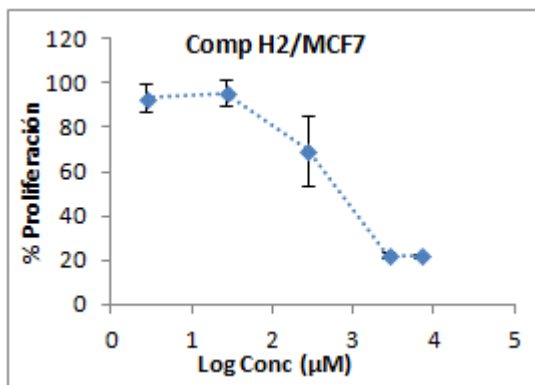


d)

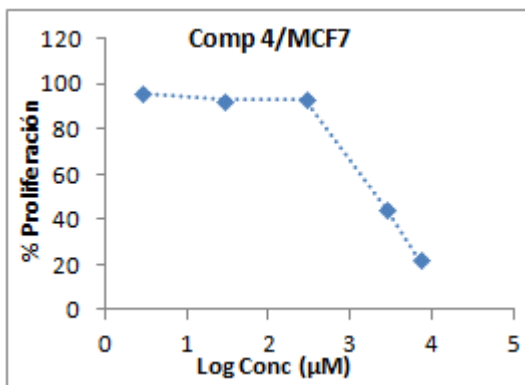


e)

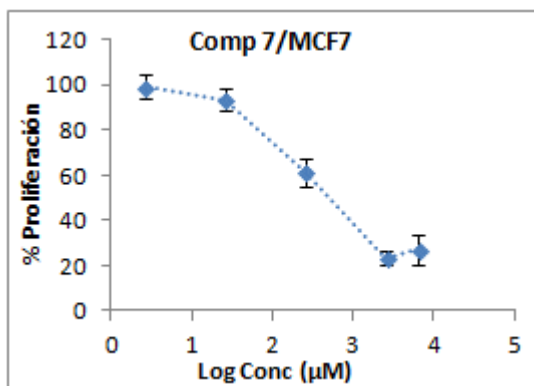
Figura 14. Efecto sobre la proliferación celular de los compuestos: a) **H2**, b) **4**, c) **7**, d) **8** y e) **9**, en la línea celular HeLa, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



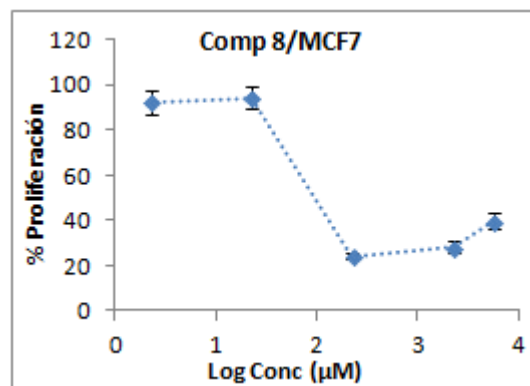
a)



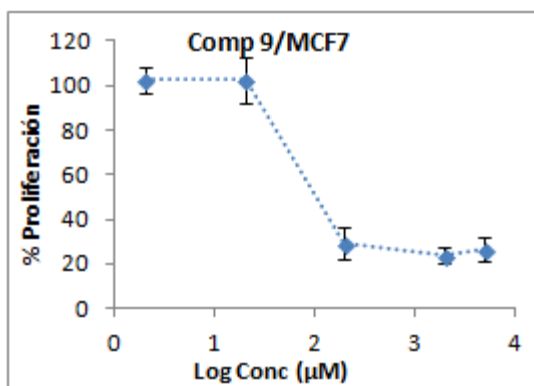
b)



c)

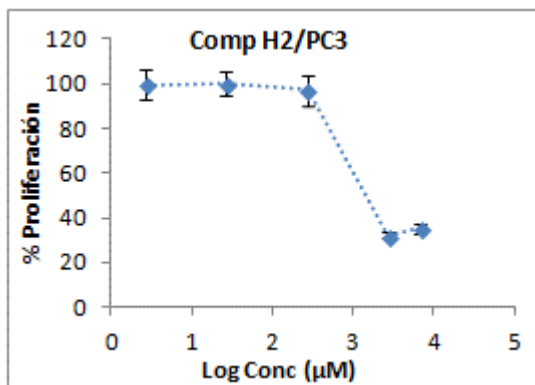


d)

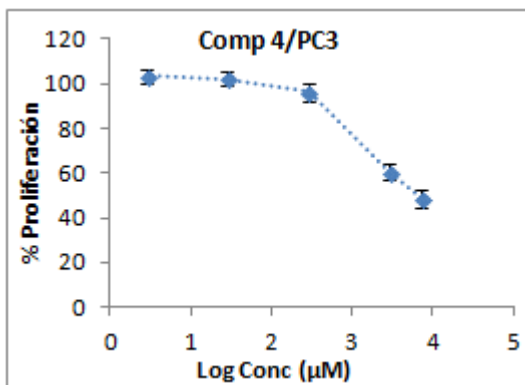


e)

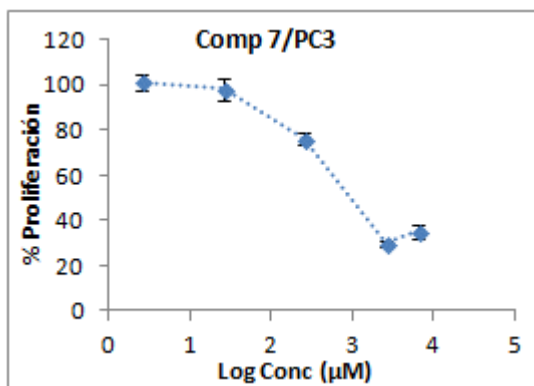
Figura 15. Efecto sobre la proliferación celular de los compuestos: a) **H2**, b) **4**, c) **7**, d) **8** y e) **9**, en la línea celular MCF7, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



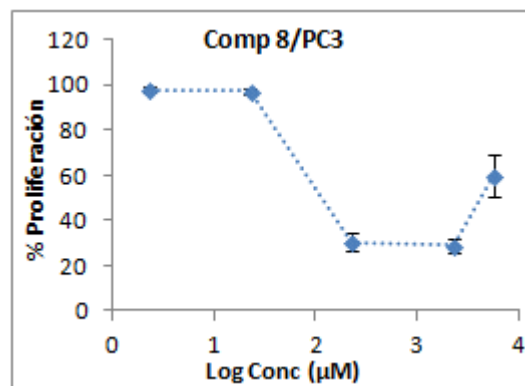
a)



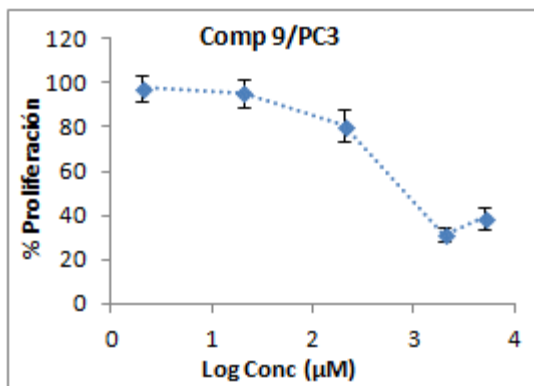
b)



c)

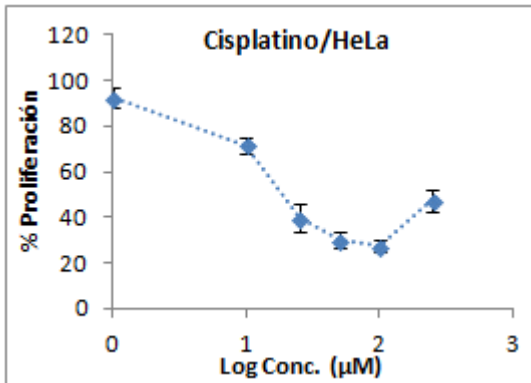


d)



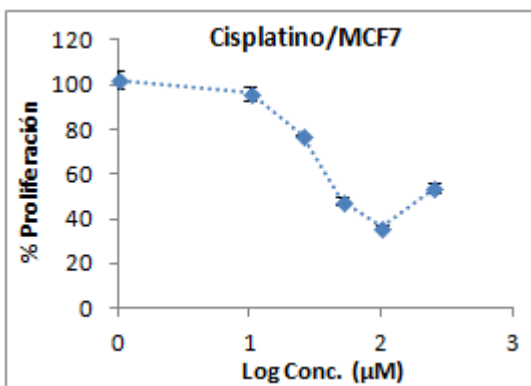
e)

Figura 16. Efecto sobre la proliferación celular de los compuestos: a) H2, b) 4, c) 7, d) 8 y e) 9, en la línea celular PC-3, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



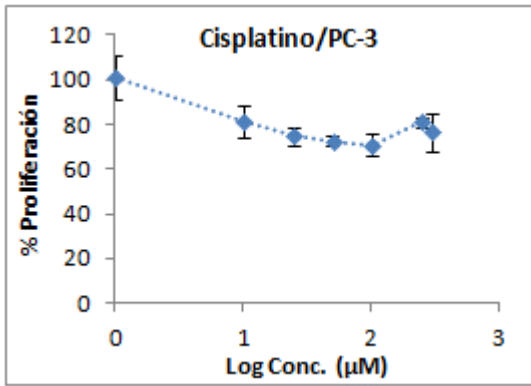
a)

Figura 17. Efecto sobre la proliferación celular del control positivo: a) Cisplatino sobre la línea celular HeLa, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



a)

Figura 18. Efecto sobre la proliferación celular del control positivo: a) Cisplatino sobre la línea celular MCF7, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación



a)

Figura 19. Efecto sobre la proliferación celular del control positivo: a) Cisplatino sobre la línea celular PC-3, evaluada con la técnica de SRB después de 24 h de su aplicación

11. Referencias

- (1) American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures for Hispanics/Latinos 2012-2014*; Atlanta, 2012.
- (2) American Cancer Society. *Cancer facts & figures 2016*; Atlanta, 2016.
- (3) Venturelli, S.; Burkard, M.; Biendl, M.; Lauer, U. M.; Frank, J.; Busch, C. *Nutrition* **2016**, 1–8.
- (4) Mandal, S. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* **2014**, 4 (S1), S13–S26.
- (5) American Cancer Society. *Global Cancer Facts & Figures*; Atlanta, 2015.
- (6) Instituto Nacional del Cáncer. Tratamiento del cáncer <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (consultado 20 de Junio, 2016).
- (7) Wu, G.; Wilson, G.; George, J.; Liddle, C.; Hebbard, L.; Qiao, L. *Cancer Lett.* **2016**, 1–8.
- (8) Furlán, R.; Mata, E. *Química combinatoria. Metodologías relacionadas con la generación de diversidad molecular*; Física, S. M. de, Ed.; Fondo de cultura económica: México, 2012.
- (9) Link, W. In *International Manual of Oncology Practice*; Springer International Publishing, 2015; pp 81–94.
- (10) Peláez, F. *An. Química* **2011**, 107 (1), 36–45.
- (11) Secretaria de Salud. *NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013*; México, 2013; p 75.
- (12) Brunton, L. *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 12th ed.; Hill, M. G., Ed.; México, 2012.
- (13) Workman, P.; Collins, I. In *Cancer Drug Design and Discovery*; Elsevier Inc: London, 2014; pp 3–53.

- (14) Zanders, E. D. In *The science and business of drug discovery*; Springer US, 2011; pp 139–158.
- (15) Salum, L. B.; Andricopulo, A. D. *Mol. Divers.* **2009**, *13* (3), 277–285.
- (16) O'Brien, P.; Haskins, J. R. In *High content screening. A powerful approach to systems, cell biology and drug discovery*; Humana Press, 2006; Vol. 356, pp 415–425.
- (17) Mahto, S. K.; Chandra, P.; Rhee, S. W. *Toxicol. Environ. Heal. Sci.* **2010**, *2* (2), 87–93.
- (18) Khan, I.; Zaib, S.; Batool, S.; Abbas, N.; Ashraf, Z.; Iqbal, J.; Saeed, A. *Bioorganic Med. Chem.* **2016**, *24* (11), 2361–2381.
- (19) Georgey, H.; Abdel-Gawad, N.; Abbas, S. *Molecules* **2008**, *13* (10), 2557–2569.
- (20) Chandrika, P. M.; Yakaiah, T.; Rao, A. R. R.; Narsaiah, B.; Reddy, N. C.; Sridhar, V.; Rao, J. V. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43* (4), 846–852.
- (21) Mendoza-Martínez, C.; Correa-Basurto, J.; Nieto-Meneses, R.; Márquez-Navarro, A.; Aguilar-Suárez, R.; Montero-Cortes, M. D.; Noguera-Torres, B.; Suárez-Contreras, E.; Galindo-Sevilla, N.; Rojas-Rojas, A.; Rodríguez-Lezama, A.; Hernández-Luis, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *96*, 296–307.
- (22) Magyar, K.; Deres, L.; Eros, K.; Bruszt, K.; Seress, L.; Hamar, J.; Hideg, K.; Balogh, A.; Gallyas, F.; Sumegi, B.; Toth, K.; Halmosi, R. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842* (7), 935–944.
- (23) Alagarsamy, V.; Raja Solomon, V.; Sheorey, R. V.; Jayakumar, R. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *73* (4), 471–479.
- (24) Abbas, S. E.; Barsoum, F. F.; Georgey, H. H.; Mohammed, E. R. *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.* **2013**, *51* (2), 273–282.
- (25) Khan, I.; Ibrar, A.; Ahmed, W.; Saeed, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 124–

169.

- (26) Aroonsri, A.; Akinola, O.; Posayapisit, N.; Songsungthong, W.; Uthaipibull, C.; Kamchonwongpaisan, S.; Gbotosho, G. O.; Yuthavong, Y.; Shaw, P. J. *Int. J. Parasitol.* **2016**, *46*, 527–535.
- (27) Zabala, D.; Echavarría, B.; Martínez, A. *Vitae* **2008**, *15*: 2, 285–289.
- (28) Javeriana, P. U. Fluoroquinolonas, sulfonamidas, trimetoprim y antisépticos urinarios <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c76.htm> (consultado 28 de Agosto, 2016).
- (29) Hitchings, G. H. *Inhibition of Folate Metabolism in Chemotherapy: The Origins and Uses of Co-trimoxazole*; Springer Science & Business Media, 1983.
- (30) Mendoza Martínez, C.; Galindo Sevilla, N.; Correa Basurto, J.; Ugalde Saldivar, V. M.; Rodríguez Delgado, R. G.; Hernández Pineda, J.; Padierna Mota, C.; Flores Alamo, M.; Hernández Luis, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *92*, 314–331.
- (31) Perez, C. J.; Lymbery, A. J.; Thompson, R. C. A. *Trends Parasitol.* **2014**, *30* (4), 176–182.
- (32) Reguera, R. M.; Calvo-Álvarez, E.; Álvarez-Velilla, R.; Balaña-Fouce, R. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2014**, *4* (3), 355–357.
- (33) Amgen. Biotecnología: desarrollo de fármacos <http://www.amgen.es/acerca/presentacion> (consultado 29 de Agosto, 2016).
- (34) Investigación, S. C. de A. a la. Cultivos celulares: técnicas http://www.scai.uma.es/servicios/ciencias_vida/cce/cce.html (consultado 29 de Agosto, 2016).
- (35) ATCC. HCT-15 (ATCC® CCL-225™) <https://www.atcc.org/Products/All/ccl-225.aspx#characteristics> (consultado 29 de Agosto, 2016).

- (36) ATCC. HeLa (ATCC® CCL-2™) <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-2.aspx> (consultado 29 de Agosto, 2016).
- (37) ATCC. MCF7 (ATCC® HTB-22™) <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx#generalinformation> (consultado 29 de Agosto, 2016).
- (38) ATCC. PC-3 (ATCC® CRL-1435™) <https://atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx> (consultado 29 de Agosto, 2016).
- (39) Toyo, S. *FEBS Lett.* **1995**, 358, 1–3.
- (40) Mustafa, A. Z. A.; Altaf, M.; Monim-ul-Mehboob, M.; Fettouhi, M.; Wazeer, M. I. M.; Isab, A. A.; Dhuna, V.; Bhatia, G.; Dhuna, K. *Inorg. Chem. Commun.* **2014**, 44, 159–163.
- (41) Putral, L. N.; Bywater, M. J.; Gu, W.; Saunders, N. A.; Gabrielli, B. G.; Leggatt, G. R.; Mcmillan, N. A. J. **2005**, 68 (5), 1311–1319.
- (42) Li, Q. Q.; Wang, G.; Reed, E.; Huang, L.; Cuff, C. F. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, 107 (5), 868–876.
- (43) Callacondo-riva, D.; Quispe-mauricio, A.; Lindo-gamarra, S.; Vaisberg, A. J. **2008**, 25 (4), 380–385.
- (44) Yu, B.; Changsheng, Y.; Wenjun, Z.; Ben, L.; Hai, Q.; Jing, M.; Guangwei, X.; Shuhua, W.; Fang, L.; Aschner, M.; Rongzhu, L. *Neurotoxicology* **2015**, 51, 58–66.
- (45) Tosso, R.; Andujar, S.; Gutierrez, L.; Angelina, E.; Ricaurte, R.; Manuel, N.; Hector, B.; Fernando, S.; Justo, C.; Ricardo, E. *J. Chem. Inf. Model* **2013**, 53 (8), 2018–2032.
- (46) Martínez, C. D.; Vargas, C. R.; Arancibia, S. R. *Rev Fac Med UNAM* **2003**, 46 (6), 229–235.