



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE DERIVADOS DE
PIRIDINAS 2, 4, 6-TRISUSTITUIDAS EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA
VIRIDIANA AURELIO NAVARRO**

Ciudad Universitaria, CDMX.

2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María Eva González Trujano
VOCAL: Dra. Paulina Del Valle Pérez
SECRETARIO: Dr. Ignacio González Sánchez
1er. SUPLENTE: M. en C. José Vergara de la Fuente
2° SUPLENTE: Dra. María Alicia Hernández Campos

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO N-015. UNIDAD DE SISTEMAS BIOLÓGICOS. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO- PLANTEL XOCHIMILCO. CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Ignacio González
Sánchez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. María Alicia
Hernández Campos

SUSTENTATE

Viridiana Aurelio Navarro



A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, de la cual siento orgullo de pertenecer desde nivel media superior. A mis profesores por su tiempo, consejos, enseñanzas y dedicación a la formación de profesionales.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo proporcionado para la realización del proyecto 251807 y por la beca otorgada para la realización de esta tesis con el número de becario 25765.

A la **Universidad Autónoma de México-Xochimilco**, en particular a la Unidad de Sistemas Biológicos por abrirme las puertas del laboratorio **N-015** de Síntesis y aislamiento de sustancias bioactivas para la elaboración experimental de mi tesis.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones y apoyo en este trabajo. Gracias por la dedicación en la mejora de mi proyecto.

Al Dr. Ignacio por su asesoría, tiempo y observaciones brindadas a lo largo del proyecto.

A la Dra. Alicia por el apoyo, el tiempo y la confianza brindada durante la realización del proyecto. Por la motivación brindada cuando más la necesitaba.



*"Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo y
lo que parecía un fracaso sin esperanza
puede convertirse en un glorioso éxito." E. Hubbard*

*Para **Ma. Inocente**, mi abuelita*

*Para **Guadalupe**, mi mamá*

*Para **Marcos**, mi papá*

*Para **Alberto**, mi hermano*

*Para **Marco A**, mi hermano*

*Para **Nataly**, mi hermana*

*Para **Jair**, mi mejor amigo*

*Para **Alma**, mi mejor amiga*

*Para **Laura, Alondra, Gabriel, Diego**, mis amigos*

Y para la persona más fuerte que conozco:

*Para **mí***

**ÍNDICE**

I.	Resumen.....	i
II.	Índice de figuras.....	iii
III.	Índice de tablas.....	v
IV.	Abreviaturas.....	vi
V.	Estructuras de compuestos de piridina.....	vii
A.	Serie 1 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas.....	vii
B.	Serie 2 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas.....	viii
C.	Serie 3 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas.....	x
1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Generalidades del cáncer.....	1
1.2	Estadísticas a nivel mundial y en México.....	2
1.3	Etiología del cáncer.....	5
1.4	Características del cáncer.....	10
1.5	Metástasis.....	13
1.6	Tratamiento del cáncer.....	14
2.	Vía de señalización AKT.....	18
2.1	Proteína quinasas B (AKT).....	20
2.2	Proteínas AKT y el cáncer.....	22
2.3	Inhibidores de AKT.....	25
3.	Ensayos de viabilidad celular.....	28
4.	JUSTIFICACIÓN.....	32
5.	HIPÓTESIS.....	33
6.	OBJETIVOS.....	33
6.1	General.....	33
6.2	Particulares.....	33
7.	MÉTODO EXPERIMENTAL.....	34
7.1	Reactivos.....	34



7.2 Líneas celulares y cultivo celular	34
7.3 Tratamiento	35
7.4 Determinación de la viabilidad celular	36
7.5 Análisis estadístico	36
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1 Actividad citotóxica de cisplatino	37
8.2 Citotoxicidad de la serie 1 de piridinas	41
8.4 Citotoxicidad del compuesto S1-9	45
8.5 Citotoxicidad del compuesto S1-5	47
8.6 Citotoxicidad de la serie 2 de piridinas	48
8.7 Citotoxicidad de la serie 3 de piridinas	51
8.8 Citotoxicidad de Tween 80	53
8.9 Citotoxicidad del inhibidor de AKT: GSK690693	56
9. CONCLUSIONES	60
10. PERSPECTIVAS	61
11. REFERENCIAS	62
ANEXO A: CONCENTRACIONES MÁXIMAS EVALUADAS	68
ANEXO B: FOTOGRAFÍAS DE LAS LÍNEAS CELULARES	69
ANEXO C: CULTIVO CELULAR	74
ANEXO D: TÉCNICAS EXPERIMENTALES	77



I. Resumen

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. El número de casos estimados al año ha ido en aumento de 14.1 millones en 2012 a 18.1 millones en 2018.

Por lo que es considerado un problema de salud grave y la segunda causa de muerte a nivel mundial. Los tratamientos para el cáncer han sido actualizados con el paso del tiempo para un mejor resultado.

Sin embargo, aún producen efectos adversos que comprometen la calidad de vida del paciente, tanto que pueden aumentar su deterioro hasta ocasionar la muerte.

La estrategia que se ha empleado en los últimos años es el diseño de fármacos dirigidos a un blanco terapéutico, con la finalidad de aumentar la eficacia de los anticancerígenos y reducir los efectos adversos.

Uno de los posibles blancos de acción que se ha considerado por su papel en diversas vías de señalización fundamentales para la regulación del metabolismo, crecimiento, proliferación y apoptosis son las proteínas quinasas principalmente proteína quinasa B (PKB) o también conocida como AKT.

El papel de AKT como nodo central de diversos procesos de proliferación de las células cancerosas lo hace un blanco molecular atractivo para el diseño de nuevos fármacos.



El equipo de investigación del laboratorio 122 del conjunto D diseñó *in silico* y sintetizó piridinas 2, 4, 6-trisustituida novedosas, simétricamente sustituidas con base a un inhibidor competitivo con actividad moderada sobre las isoformas de AKT.

La actividad anticancerígena de las tres series de piridinas se evaluó por un método espectrofotométrico empleando MTT en cinco líneas celulares de cáncer, las cuales representan algunos de los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial y que se ha reportado que presentan hiperactividad de AKT.

Dos compuestos con actividad citotóxica significativa se identificaron de la **Serie 1** y seis compuestos de la **Serie 3**, de los cuales se calculó la CI_{50} en al menos tres de las líneas de estudio siendo la más sensible la línea celular PC-3.

**II. Índice de figuras**

Figura 1.	Vista general de la secuencia biológica de los pasos involucrados desde la carcinogénesis a la metástasis.....	2
Figura 2.	Número de muertes por cáncer a nivel mundial estandarizadas por edad para ambos sexos en 2012.....	3
Figura 3.	Estimación del número de muertes por cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial en 2012.....	4
Figura 4.	Factores que originan el cáncer.....	8
Figura 5	El papel de los genes y el medio ambiente en el desarrollo del cáncer.....	9
Figura 6.	Alteraciones encontradas frecuentemente en células cancerosas.....	10
Figura 7.	Modelo de proliferación clonal de una progresión neoplásica ...	11
Figura 8.	Cascada metastásica	14
Figura 9.	Orientación terapéutica de blancos moleculares contra el cáncer	16
Figura 10.	Representación esquemática de la vía de AKT y los efectores posteriores	19
Figura 11.	Clasificación de las proteínas quinasas identificadas en el genoma humano.....	21
Figura 12.	Estructura de los miembros de la familia PKB y el grado de homología entre los dominios: PH (homología de pleckstrina), quinasa central y HM (carboxilo terminal)	22
Figura 13.	Estructuras químicas de inhibidores de AKT.....	27
Figura 14.	Mecanismo de resistencia a fármacos mediada por el medio ambiente	28
Figura 15.	La reducción de MTT a formazan en células vivas.....	30
Figura 16.	Estructuras generales de las series de piridinas 2, 4, 6- trisustituidas.....	40
Figura 17.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la Serie 1 a una concentración de 50 μ M a 48 h de tratamiento.....	42
Figura 18.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la Serie 1 a una concentración de 50 μ M a 72 h de tratamiento	43
Figura 19.	Viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a la piridina S1-3 a diferentes concentraciones a 48 h de tratamiento.....	44
Figura 20.	Viabilidad de las líneas celulares SW-620 y SK-LU-1 expuestas a la piridina S1-9 a diferentes concentraciones a 72 h de tratamiento.....	46



Figura 21.	Viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 y PC-3 expuestas a la piridina S1-5 a 72 h de tratamiento	47
Figura 22.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la Serie 2 a una concentración de 50 μ M a 48 h de tratamiento.....	49
Figura 23.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la Serie 2 a una concentración de 50 μ M a 72 h de tratamiento.....	50
Figura 24.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la Serie 3 a una concentración de 50 μ M a 72 h de tratamiento.....	52
Figura 25.	Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas con el inhibidor de AKT GSK690693 a 72 h de tratamiento.....	57
Figura 26.	Líneas celulares en medio de cultivo DMEM y RPMI a 72 h de tratamiento.....	69
Figura 27.	Líneas celulares PC-3 y SW-360 expuestas a compuestos de la Serie 1 de piridinas a 72 h de tratamiento.....	70
Figura 28.	Línea celular PC-3 expuesta a compuestos de la Serie 2 de piridinas a 50 μ M a 72 h de tratamiento.....	71
Figura 29.	Líneas celulares expuestas a compuestos de la Serie 3 de piridinas a 50 μ M y su máxima concentración a 72 h de tratamiento.....	72
Figura 30.	Líneas celulares expuestas a compuestos de la Serie 3 a 50 μ M y su máxima concentración de piridinas a 72 h de tratamiento.....	73
Figura 31.	Representación esquemática de la cámara de Neubauer.....	79

**III. Índice de tablas**

Tabla 1.	Ejemplos de asociación biológica, biofísica y bioquímica con cánceres humanos	6
Tabla 2.	Algunos fármacos aprobados para el tratamiento de tumores sólidos y su blanco terapéutico	17
Tabla 3.	Anormalidades en las vías de señalización relacionadas con PI3/AKT en cáncer	23
Tabla 4.	Porcentaje de sobreexpresión de AKT en cánceres humanos.....	24
Tabla 5.	Tipos de Inhibidores de AKT	26
Tabla 6.	Derivados de piridinas trisustituidas evaluadas en este trabajo en líneas celulares	34
Tabla 7.	Número de células empleadas en ensayos de viabilidad dependiendo de la duración del tratamiento.....	35
Tabla 8.	Valores de CI ₅₀ calculadas para el compuesto cisplatino en las líneas celulares empleadas a 48 y 72 h de tratamiento.....	38
Tabla 9.	Valores de CI ₅₀ de Cisplatino en diferentes líneas celulares a 72 h de tratamiento	39
Tabla 10.	Valores de CI ₅₀ calculadas para el compuesto S1-3 a 48 y 72h de tratamiento.....	45
Tabla 11.	Valores de CI ₅₀ calculadas para el compuesto S1-9 a 72 h de tratamiento	46
Tabla 12.	Valores preliminares de CI ₅₀ de la Serie 3 de piridinas a 72 h de tratamiento	51
Tabla 13.	Valores de CI ₅₀ de Tween 80 en algunas líneas celulares empleadas a 72 h de tratamiento	54
Tabla 14.	Sistema de Clasificación de Biofármacos.....	55
Tabla 15.	Valores preliminares de CI ₅₀ del inhibidor de AKT GSK690693 en las diferentes líneas celulares empleadas a 72 h de tratamiento	57
Tabla 16.	Concentraciones máxima de los compuestos de las series de piridinas 2, 4, 6-trisustituidas	68

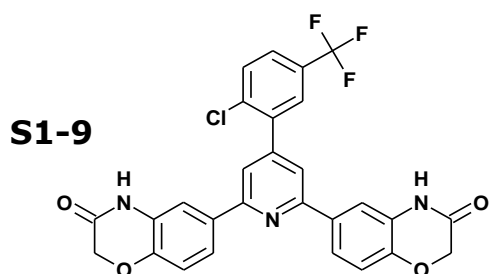
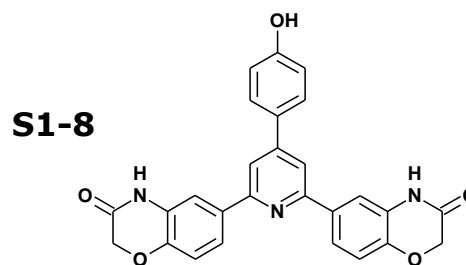
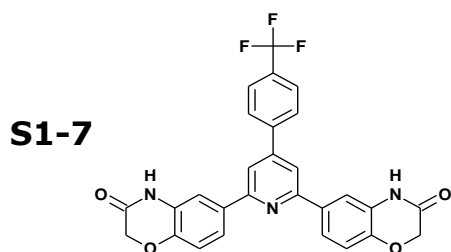
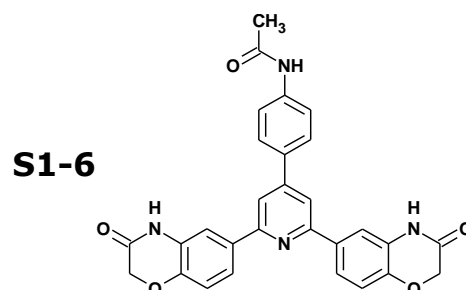
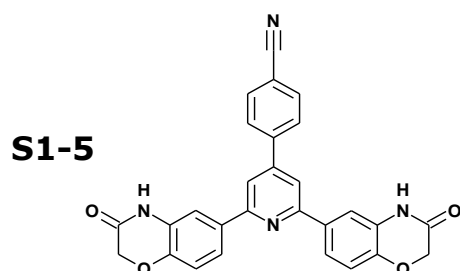
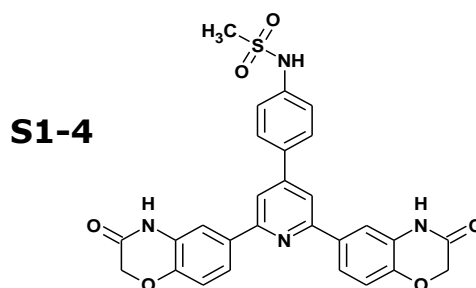
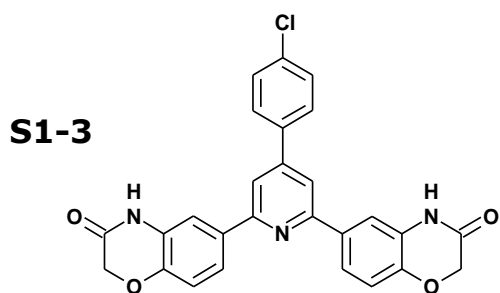
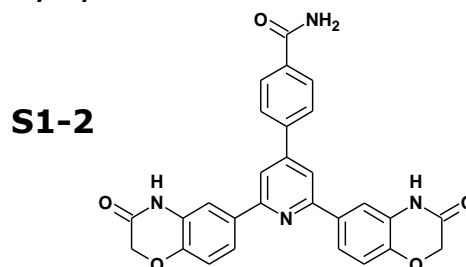
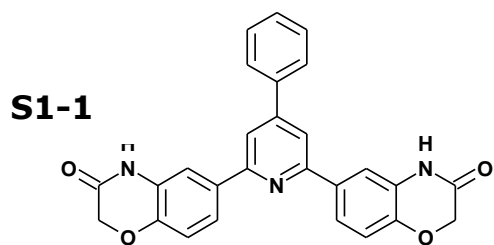
**IV. Abreviaturas**

°C	Centígrado
μM	Micromolar
Abs	Absorbancia
AKT	Proteína quinasa B
ATCC	American Type Culture Collection
BCS	Sistema de Clasificación de Biofármacos (Biopharmaceutics Classification System)
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
CO₂	Dióxido de carbono
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco Modified Eagles Minimal essential medium</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etilendiamonotetraacético
EGFR	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (Epidermal growth factor receptor)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
g/mol	Unidades de masa molecular
h	Hora
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (<i>International Agency For Research on Cancer</i>)
min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Sal de tetrazolio bromuro de [3- (4, 5-dimetiltiazolil-2) -2,5 difeniltetrazolio]
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
nm	Nanómetro
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos (
PDGFR	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet derived growthfactor receptors)
PH	Homología de pleckstrina (Pleckstrin homology)
pH	Potencial de hidrógeno
RPMI	Medio Rosswell Park Memorial Institute
PTEN	Fosfatasa y homólogo de tensina (Phosphatase and tensin homolog)
RE	Receptor de estrógeno
SFB	Suero fetal bovino
UV	Radiación ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Grwth Factor)
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VPH	Virus del papiloma humana



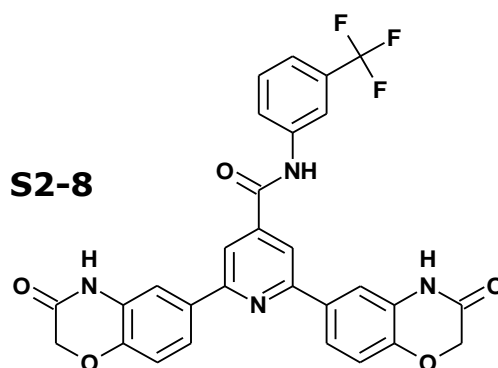
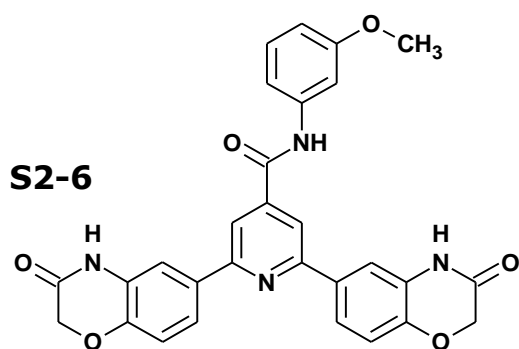
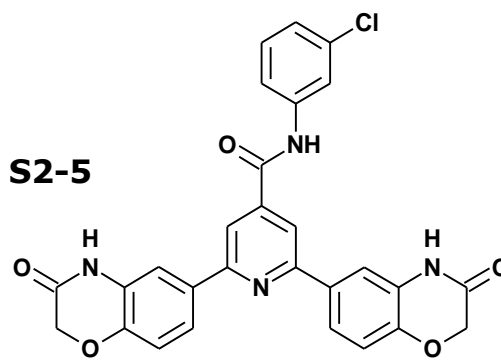
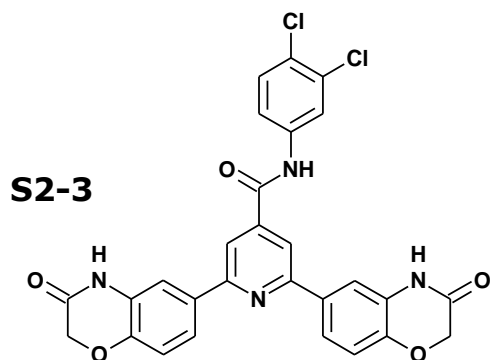
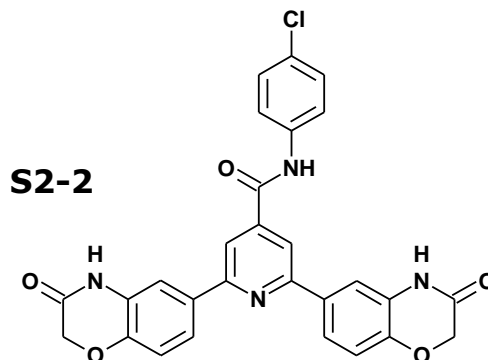
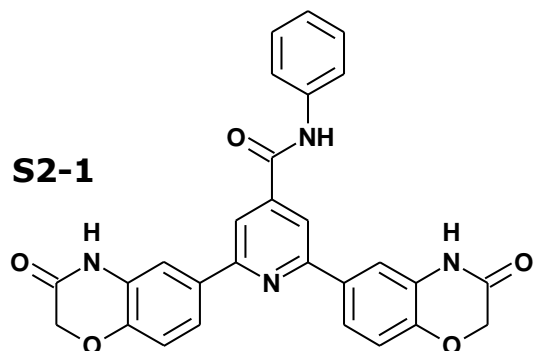
V. Estructuras de compuestos de piridina

A. Serie 1 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas





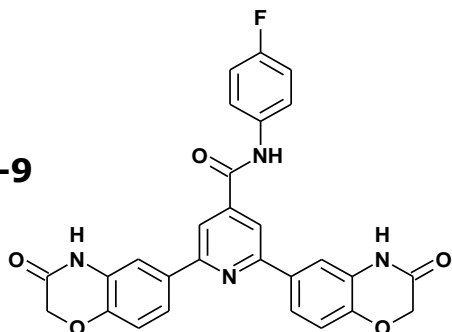
B. Serie 2 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas



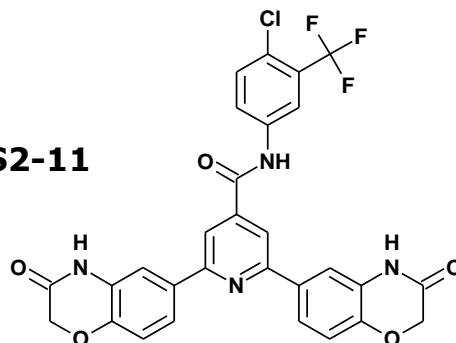


B. Serie 2 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas

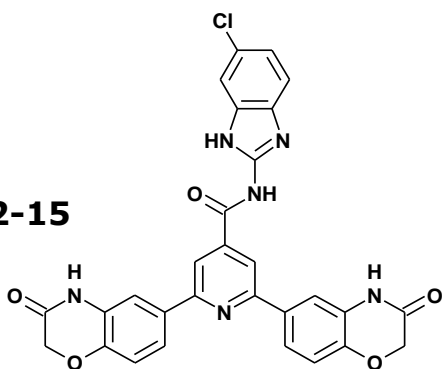
S2-9



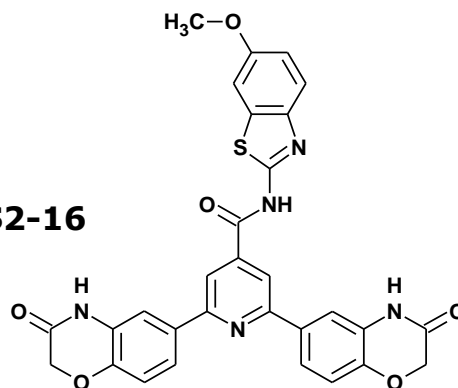
S2-11



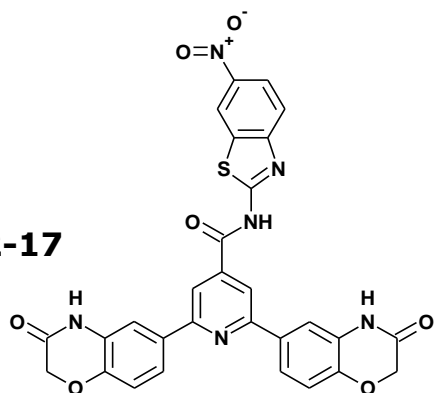
S2-15



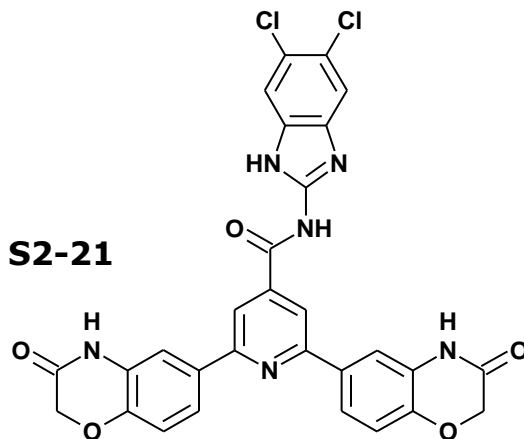
S2-16



S2-17

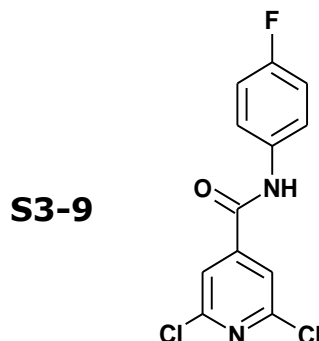
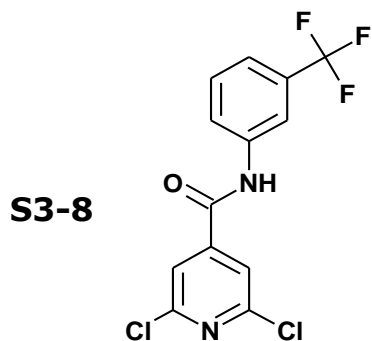
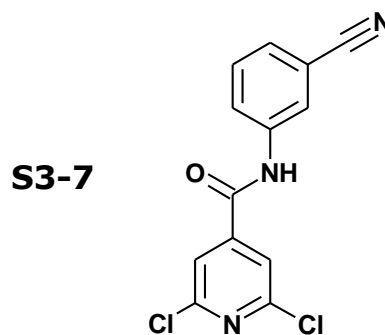
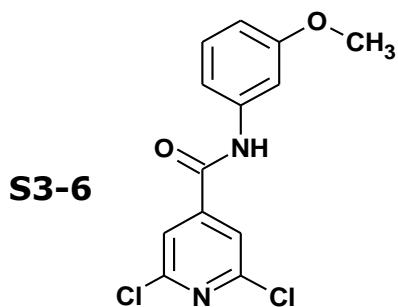
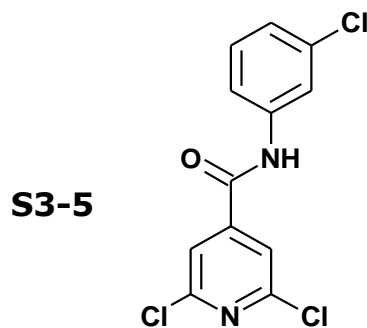
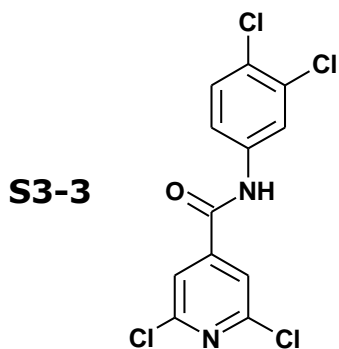
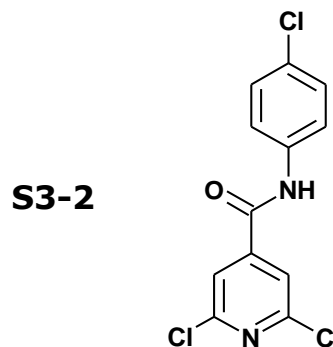
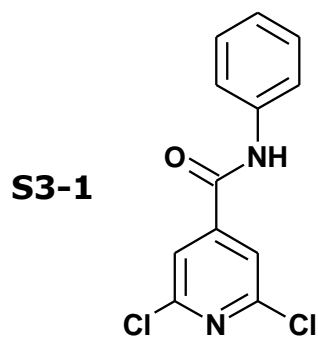


S2-21



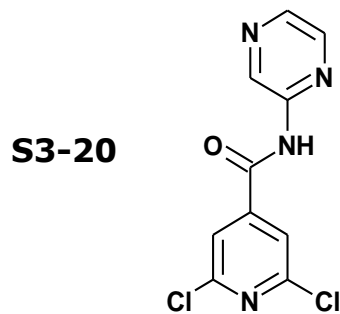
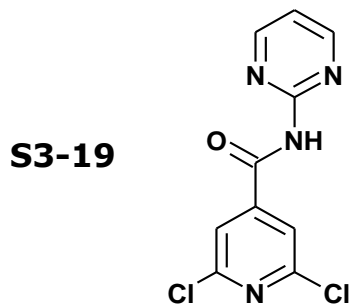
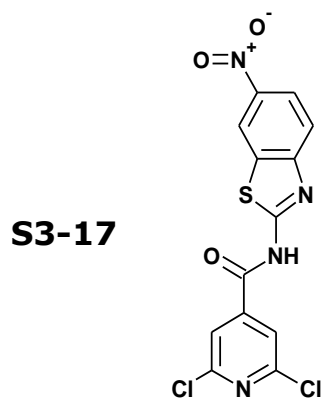
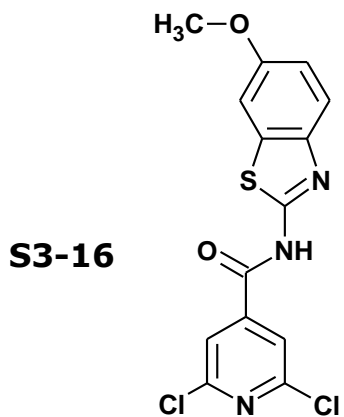
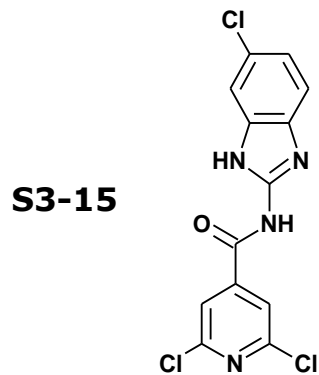
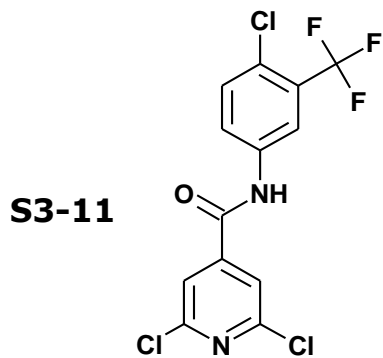


C. Serie 3 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas





C. Serie 3 de piridinas 2, 4, 6 trisustituidas





1. MARCO TEÓRICO

1.1 Generalidades del cáncer

El cuerpo está formado por billones de células las cuales crecen y se dividen para formar nuevas células cuando el cuerpo las necesita. Al envejecer o dañarse son reemplazadas mediante el proceso de ciclo celular (reproducción de las células) cuya implicación en el desarrollo del cáncer resulta evidente y esencial, ya que el conjunto de enfermedades englobadas bajo este nombre tiene en común la alteración en la reproducción celular [1, 2].

Los cánceres ocurren en la mayoría de los tipos de células, sin embargo, en comparación con los aproximadamente 300 tipos diferentes de células en el cuerpo humano, podemos reconocer 200 tipos diferentes de cánceres humanos. El cáncer se puede clasificar de dos maneras: por el sitio de origen, es decir su ubicación en el cuerpo o por los tipos de tejidos afectados [1, 3].

La carcinogénesis es el proceso de transformación de células normales a células cancerosas (Figura 1). Dicho proceso consta de cuatro pasos: iniciación del tumor (días), promoción del tumor (10-20 años), conversión maligna y progresión tumoral (1-5 años) [5].

La iniciación del tumor es caracterizada por un daño genético irreversible y cambios epigenéticos. La promoción del tumor incluye la expansión clonal de células con daño celular. El siguiente paso es la conversión maligna la cual consiste en la formación de una célula pre-neoplásica en una que expresa el fenotipo maligno. [4]

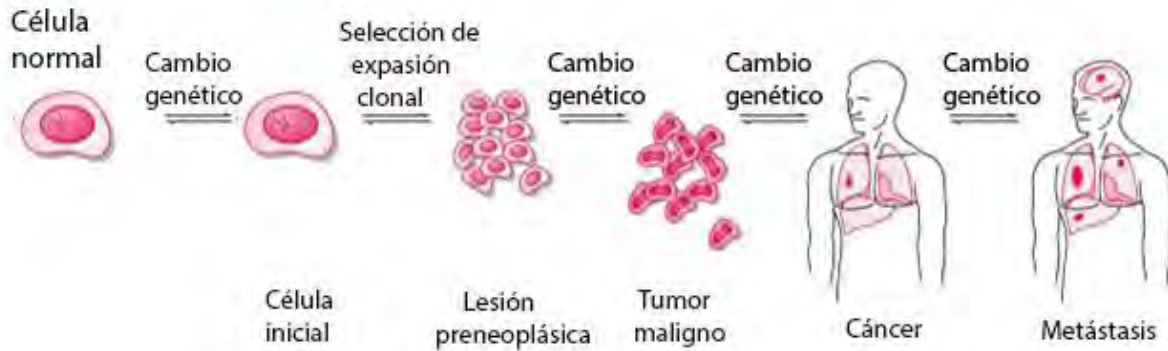


Figura 1. Vista general de la secuencia biológica de los pasos involucrados desde la carcinogénesis a la metástasis [4].

La etapa final que define y caracteriza el cáncer es la progresión tumoral. Esta etapa comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de las células malignas a adquirir características más agresivas como inestabilidad genómica y crecimiento incontrolado que con el paso del tiempo se convierte en una entidad invasiva o metastásica, con muchos pasos intermedios potenciales en el camino [4].

1.2 Estadísticas a nivel mundial y en México

Se ha visto un notable incremento en el número de casos de cáncer a nivel mundial atribuido al crecimiento poblacional, el envejecimiento y a un aumento en la exposición a factores de riesgo (Figura 2). A posicionado al cáncer como la segunda causa de muerte a nivel mundial [11].



Según las estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en 2012 hubo 14.1 millones de nuevos casos. En 2015 se atribuyó a esta enfermedad 8.8 millones de defunciones. Para el 2018 el número de nuevos casos aumentó a 18.1 millones. Además, cerca del 70 % de las muertes se registran en países de ingresos medios y bajos [11].

Para el año 2030, se espera que el número de nuevos casos a nivel mundial aumente a 21.7 millones y el número de muertes incremente a 13 millones, lo anterior debido al crecimiento y envejecimiento de la población [5, 6].

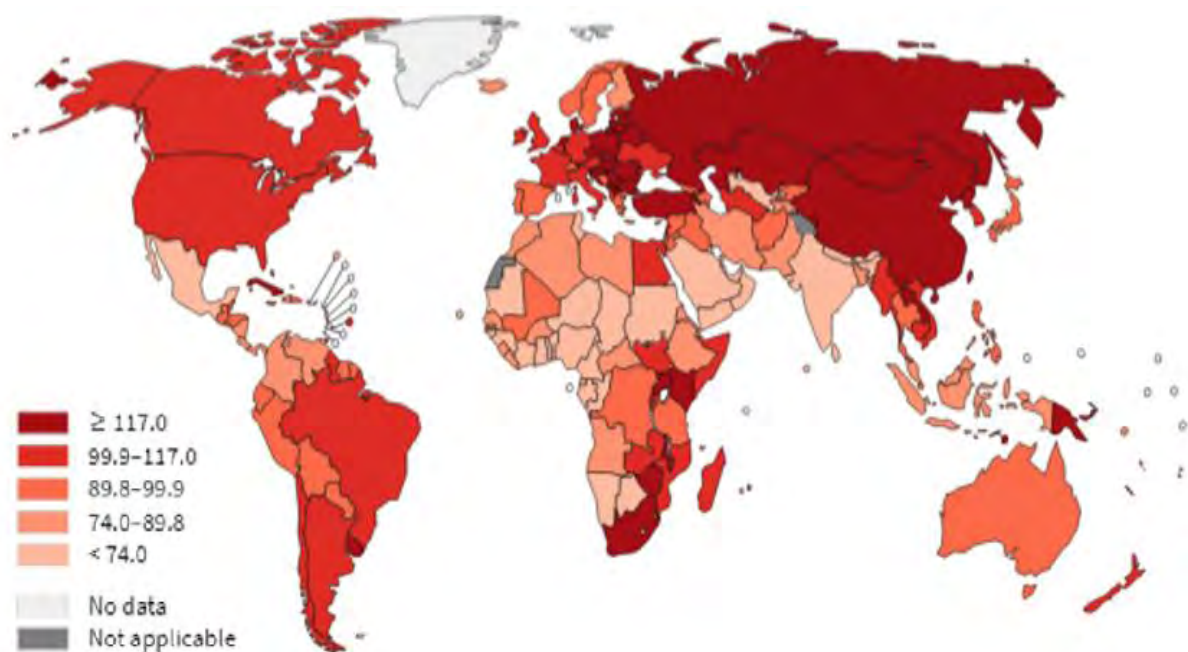


Figura 2. Número de muertes por cáncer a nivel mundial estandarizadas por edad para ambos sexos en 2012 [5].



En el año 2012, a nivel mundial los cánceres con mayor tasa de mortalidad en hombres son de pulmón, hígado y estómago; mientras que en mujeres se encuentra el de mama, pulmón y colorrectal (Figura 3) [15].

En México, el cáncer se encuentra entre las principales causas de muerte ocupando el tercer lugar después de enfermedades relacionadas al corazón y diabetes. Tan sólo en el año 2015 se registraron 79514 defunciones [7].

El cáncer de mama, desde el año 2006, se encuentra como la principal causa de muerte en mujeres, afectando a todos los grupos socioeconómicos. Es de mayor incidencia en población de 35 a 44 años de edad. En el año 2015, se registró un total de 6304 defunciones por este tipo de cáncer [7-9].

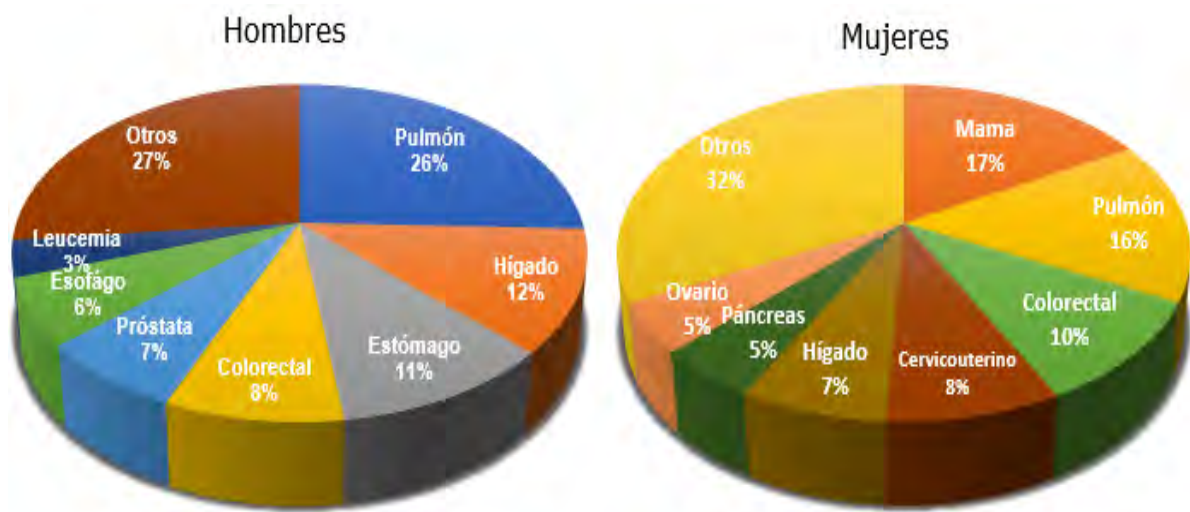


Figura 3. Número estimado de muertes por cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial en 2012 [9].

En hombres, el cáncer ocupa el tercer lugar de causa de muerte, siendo el cáncer de próstata la principal, con registró un total de 6447 defunciones en 2015. En segundo lugar, se encuentra el cáncer de pulmón



debido a una mayor incidencia de tabaquismo en hombres reportado en el año 2016. En 2017 se registró un total de fumadores de 15 millones de los cuales 11 millones fueron hombres y 4 millones mujeres [7, 10, 11].

1.3 Etiología del cáncer

El cáncer es considerado un conjunto de enfermedades con origen multifactorial, esto debido a los múltiples factores que pueden ocasionar su origen; algunos dependen de la constitución genética del individuo, otros dependen de su entorno y forma de vida [12, 13].

Las mutaciones del genoma responsables del cáncer son producidas por agentes carcinógenos, así como errores espontáneos o inducidos en la replicación y reparación del ADN [4].

La exposición a sustancias químicas que han demostrado tener estas propiedades ocurre de forma continua y en cantidades variables. La exposición puede ser en alimentos, el aire, el agua, el estilo de vida y ocupación laboral. El órgano más afectado por las diferentes exposiciones a sustancias químicas es el pulmón (Tabla 1) [15].

Los carcinógenos se pueden clasificar en tres categorías: físicos, químicos y biológicos (Figura 4). Entre los carcinógenos físicos podemos encontrar las radiaciones ultravioletas (UV) y ionizantes [15].

La radiación UV proviene además del sol, de lámparas solares y cabinas de bronceado. La exposición prolongada a este tipo de radiación ocasiona daños a la piel (pigmentación, decoloración y pecas), un envejecimiento prematuro y destrucción de proteínas de elastina y colágeno [15-17].



Entre los carcinógenos químicos, podemos encontrar a contaminantes provenientes de los alimentos. Los contaminantes de mayor relevancia en alimentos son las aflatoxinas. Dicho contaminante es un tipo de toxina producida por ciertos hongos (entre ellos el *Aspergillus parasiticus*) en cultivos agrícolas como el maíz, cacahuates, la semilla de algodón y los frutos secos [20].

Tabla 1. Ejemplos de asociación biológica, biofísica y bioquímica con cánceres humanos. [14].

Carcinógenos	Sitios de cáncer	Fuente ocupacional/actividad
Arsénico	Pulmones, piel	Electricistas, fundiciones, medicamentos
Amianto/asbesto	Mesotelioma, pulmones	Azulejos de techo y piso
Benceno	Sangre y ganglios linfáticos	Petróleo, pinturas, detergentes y caucho
Berilio	Pulmones	Combustible de misiles, reactor nuclear
Cadmio	Próstata	Baterías, pinturas y recubrimiento
Cromo	Pulmón	Conservantes, pigmentos, pinturas
Óxido de etileno	Sangre	Agente de maduración para frutas, gases
Níquel	Nariz, pulmón	Baterías, cerámica, aleaciones ferrosas
Cloruro de vinilo	Hígado	Refrigerador, pegamento, PVC
Gasolina	Pulmón, sangre	Petróleo
Formaldehído	Nariz, faringe	Trabajadores de hospital/laboratorio
Tinte de cabello	Vejiga	Peluquero, barbero.
Hollín	Piel	Limpiadores de chimeneas
Radiación ionizante	Médula ósea	Técnico de radiología
Virus hepático- B, C	Hígado	Trabajadores de hospital, consumidores de drogas
Virus de VPH / Herpes	Cuello uterino, piel, cabeza/cuello	Múltiples parejas sexuales
<i>Helicobacter pylori</i>	Estómago	Infección crónica



Otro carcinógeno de importancia alimentaria son las aminas heterocíclicas. La producción de aminas heterocíclicas como la aminoimidazoazareno (AIA) se produce por una exposición de los alimentos a temperaturas mayores de 108 °C por tiempo prolongado [20].

El consumo de tabaco es otro ejemplo de exposición a carcinógenos químicos. El humo de este producto está formado de una mezcla compleja de químicos generados por la combustión del tabaco y de sus aditivos como el benceno, monóxido de carbono, plomo y arsénico por mencionar algunos. [16].

Por otro lado, entre los carcinógenos biológicos podemos encontrar virus, parásitos y bacterias. Ejemplo de aquellos microorganismos que están asociados con el origen del cáncer se encuentran: Virus del papiloma humano (VPH) como el principal virus que origina cáncer de cuello uterino; virus de hepatitis B y C causando cáncer de hígado; el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) aumenta el riesgo de linfoma y sarcoma; *Helicobacter pylori* ocasiona cáncer de estómago y esófago [14-16].

La exposición a carcinógenos es un factor de riesgo, sin embargo, se deben considerar otros factores (Figura 5). El medio ambiente tiene una mayor influencia como causa de cáncer en comparación con la influencia genética. La evidencia indica que, de todas las muertes relacionadas con el cáncer, el 35 % se debe a la dieta, el 30 % al tabaco, 15-20 % por infecciones y sólo el 5-10 % de todos los casos se deben a defectos genéticos [15].

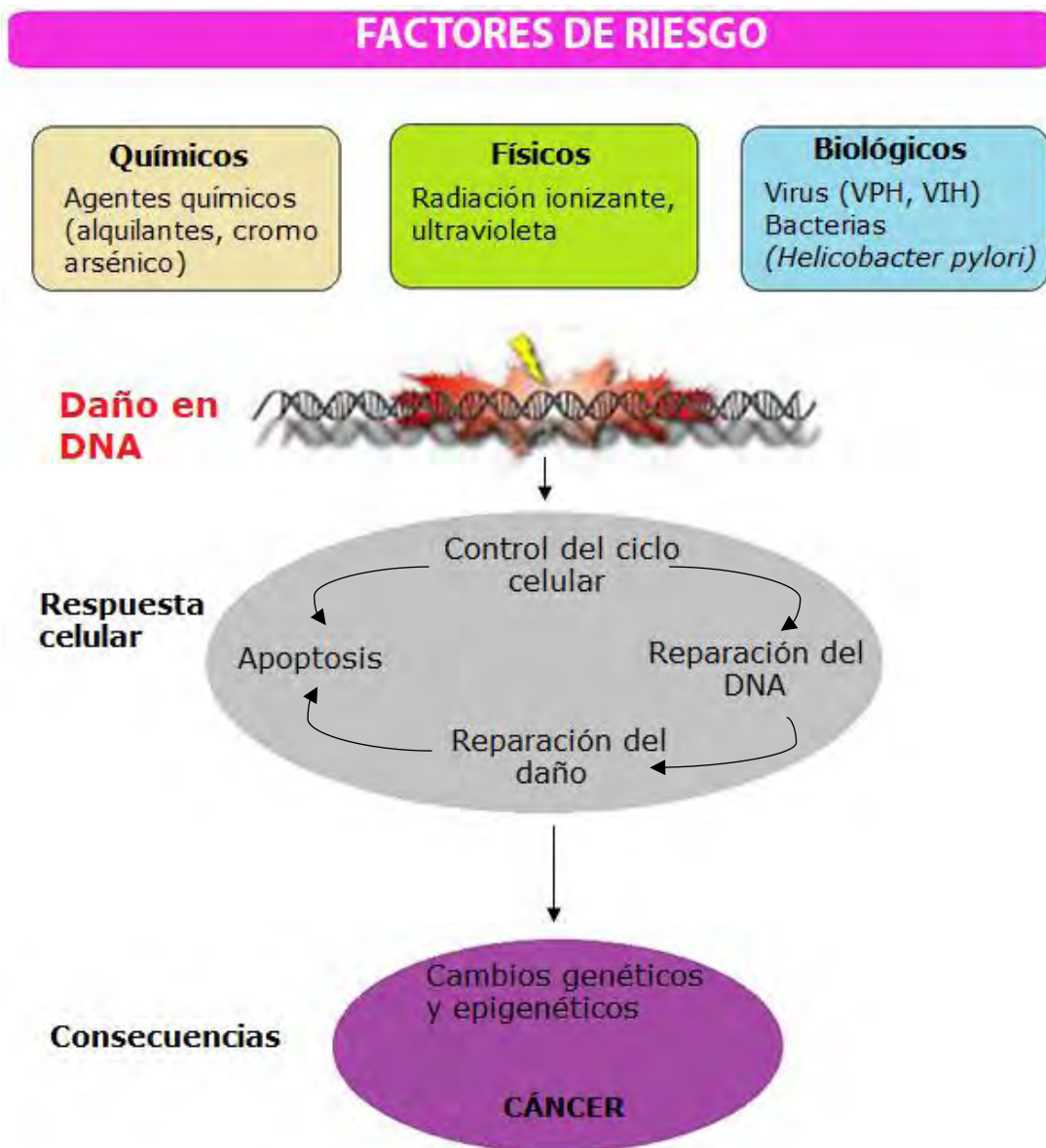


Figura 4. Factores que originan el cáncer [15].

Del total de casos de cáncer originados por defectos genéticos, en el cáncer testicular el 24 % tuvo influencia genética mientras que el cáncer de mama fue de 5 %. Es decir que la influencia genética es mayor para el cáncer testicular que el de mama, sin olvidar que esto representa solo 5-10 % de los factores para su origen (Figura 5) [16, 17].



El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta de modo importante con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo [21]. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la pérdida en la eficacia de los mecanismos de reparación celular que suele ocurrir con la edad.

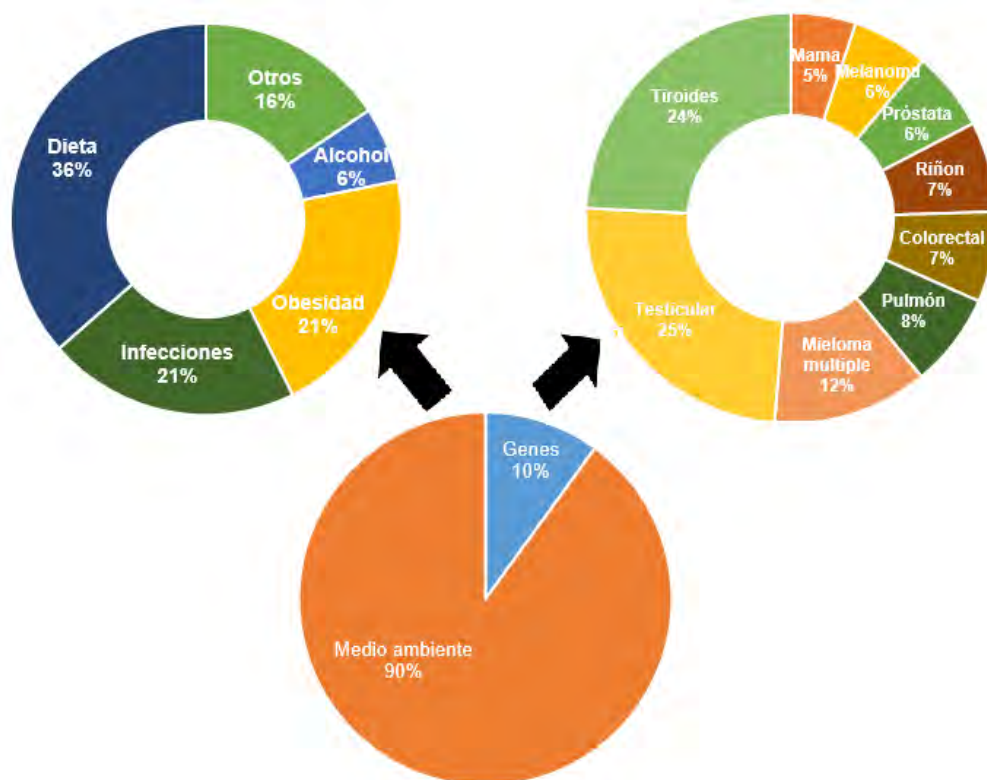


Figura 5. El papel de los genes y el medio ambiente en el desarrollo del cáncer [15].



1.4 Características del cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales. Las células cancerosas difieren en muchos aspectos con células sanas como falta de diferenciación [17].

Hanahan en 2011 menciona las alteraciones mínimas que brindan a una célula cancerosa la capacidad de desarrollarse las cuales son: la autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad en las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis y metástasis del tejido (Figura 6) [18].

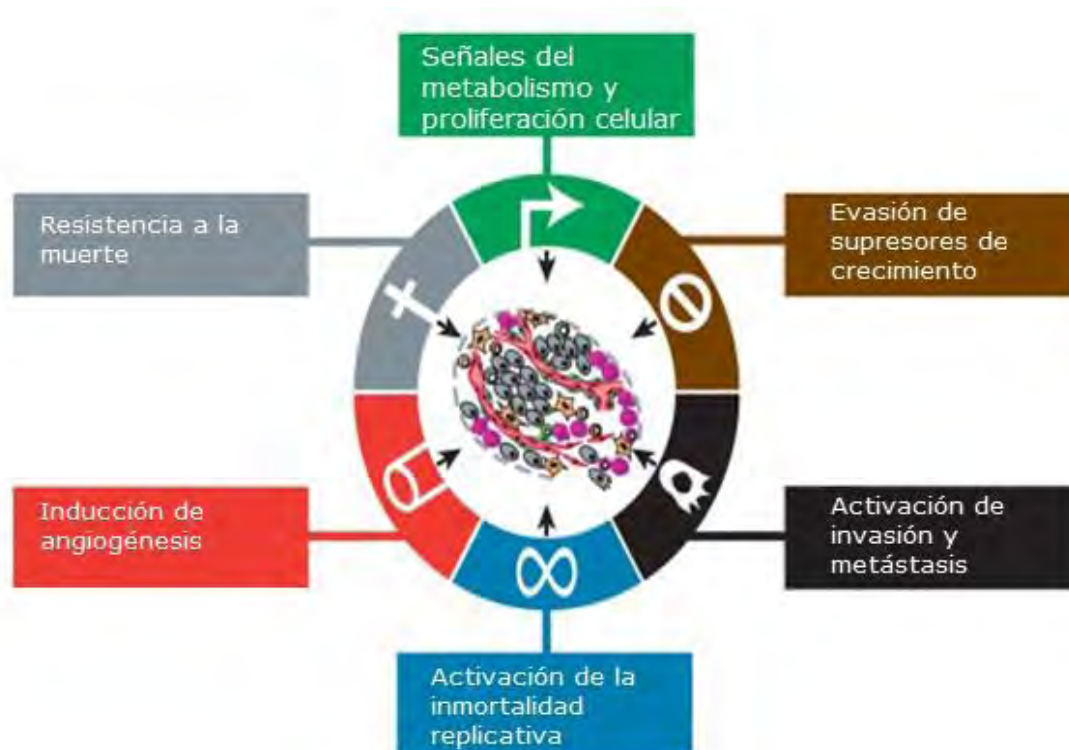


Figura 6. Alteraciones encontradas frecuentemente en células cancerosas [18].



Para que ocurra la transformación de una célula normal a una tumoral se requiere de una acumulación de mutaciones en los genes, por ejemplo, en oncogenes. Las mutaciones en el ciclo celular ocurren frecuentemente, sin embargo, la célula cuenta con mecanismos de corrección. Si los mecanismos fallan se realiza un autodiagnóstico que comprueba la disfunción desencadenando un proceso de suicidio celular denominado apoptosis [19].

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que ocurre en organismos multicelulares y proporciona un mecanismo fisiológico para la eliminación de células dañadas o anormales [20, 21].

Por lo que el progreso clonal de células mutadas que logran escapar a los mecanismos de reparación (Figura 7) continúan su reproducción y con ello una acumulación de mutaciones progresiva [2, 19].

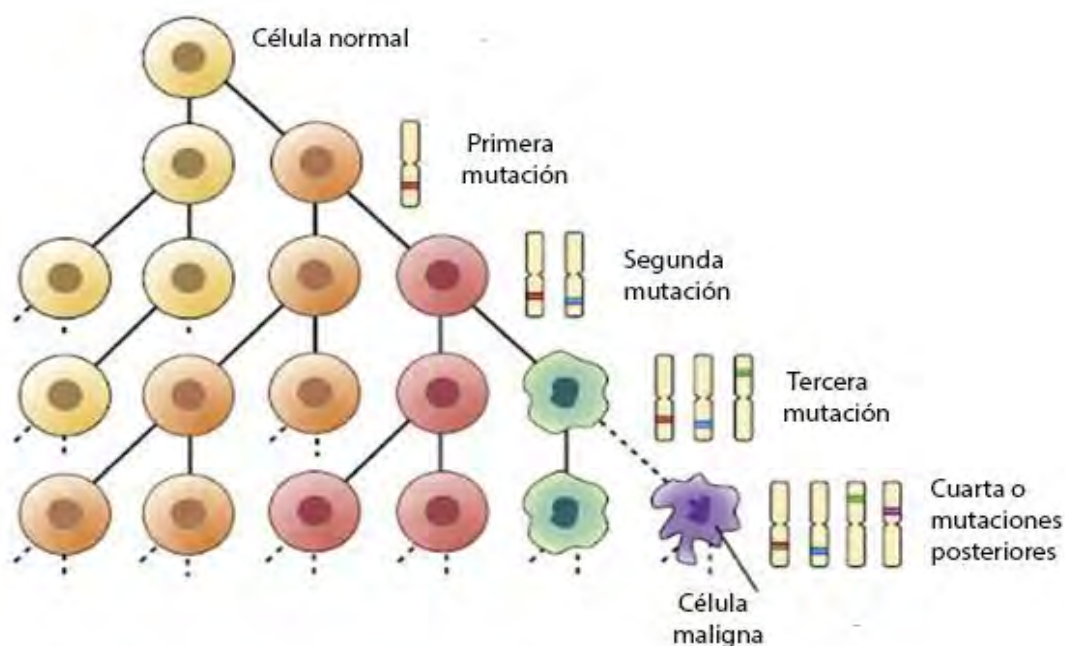


Figura 7. Modelo de proliferación clonal de una progresión neoplásica [19].



Las mutaciones afectan principalmente tres tipos de genes que codifican muchos tipos de proteínas importantes que ayudan a controlar el crecimiento y la proliferación celular: a) proto-oncogenes, b) genes supresores de tumor y c) genes de reparación de ácido desoxirribonucleico (DNA)[22].

Los primeros genes afectados e involucrados con el desarrollo de cáncer son los proto-oncogenes los cuales son genes que se expresan o participan en el crecimiento normal de células. El resultado de la mutación de estos genes se conoce como oncogén y da origen a proteínas que están enviando señales de proliferación sostenida, las cuales son responsables de la formación de células cancerosas [22].

La promoción del cáncer se realiza a nivel de proteína, ya sea modificando el segmento de codificación de la proteína o alterando su expresión. Por otro lado, otros genes relevantes en la carcinogénesis son los genes supresores de tumores, mismos que codifican proteínas que retrasan o inhiben la progresión celular en una etapa específica del ciclo celular [3, 19].

En contraparte, los genes reparadores del DNA son esenciales para el mantenimiento e integridad del genoma. Se han identificado más de 125 genes implicados en la reparación del DNA. Estos genes funcionan en conjunto por diversas vías que implican el reconocimiento y eliminaciones de lesiones de DNA, la tolerancia al daño y la protección contra errores de incorporación que puedan ocurrir durante la replicación o reparación del DNA [22-24].



1.5 Metástasis

Como se mencionó, la carcinogénesis es el proceso de transformación de células normales a cancerosas. Una vez iniciado el proceso de en alguna parte del cuerpo las células que adquieren características más agresivas comienzan un proceso de invasión denominado metástasis [20, 25]. Las alteraciones en las interacciones mecánicas entre las células y su entorno contribuyen a la displasia tisular asociada con el inicio del tumor [4, 26].

La metástasis se refiere a la transferencia de células tumorales desde un órgano o parte de él hacia otro no directamente relacionado por contigüidad y constituye la complicación más grave y la principal causa de muerte en pacientes [5].

El proceso de metástasis inicia con la interrupción de la interacción local célula-célula, alterando la membrana basal, invadiendo e infiltrando tejido circunvecino, alcanzando y penetrando al interior de los vasos sanguíneos. El proceso metastático continúa con una supervivencia en la circulación para su establecimiento y posterior desarrollo de tumores secundarios [27].

De esta manera la metástasis consiste en cinco etapas que en conjunto se denominan cascada metastásica (Figura 8).

- **Invasión y migración:** Células individuales del tumor primario invaden tejido sano adyacente.
- **Intravasación:** Las células se adentran al sistema circulatorio. Las células neoplásicas secretan enzimas que permiten la infiltración a los vasos.



- o **Diseminación:** Selección de células tumorales particularmente resistentes y agresivas.
- o **Extravasación:** Las células dejan la circulación sanguínea penetrando al endotelio por medio de enzimas proteolíticas o de proliferación.
- o **Proliferación y angiogénesis.** Establecimiento de las células tumorales al tejido distante, producción de tumores secundarios que para asegurar la vascularización se induce angiogénesis [3, 28].

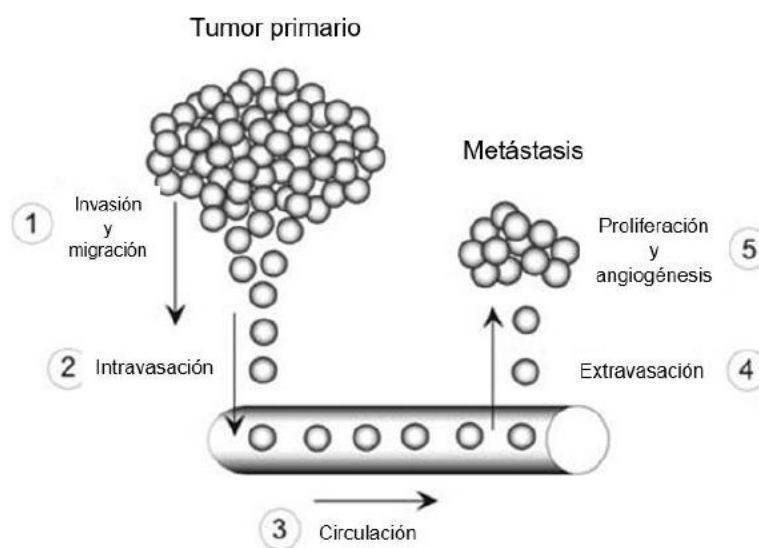


Figura 8. Cascada metastásica [28].

1.6 Tratamiento del cáncer

El cáncer se caracteriza por un crecimiento celular indiscriminado, autónomo y con capacidad de metástasis al lograr escapar a los mecanismos de control del organismo. Por ende, el tratamiento se debe realizar teniendo en cuenta algunas características como son: edad del paciente, evolución o etapa del cáncer, localización del cáncer, la diseminación y salud general de la persona.



La gran variedad de tipos de cáncer dificulta encontrar un tratamiento eficaz para una persona en particular. Los tratamientos más frecuentemente usados para combatir dicha enfermedad son: cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia [6].

La radioterapia suele emplearse en el 40 % de casos de pacientes diagnosticados en etapa inicial, con la finalidad de reducir el tamaño tumoral en etapa temprana, siendo su efecto de manera local o definida en la zona de origen previniendo su invasión. Es comúnmente empleada en combinación con quimioterapia [29].

Ambos métodos suelen tener efectos adversos desde menores hasta graves que pueden comprometer aún más la salud del paciente. Entre estos efectos se encuentra la fatiga, vómito, cambios en la piel, caída de cabello, anemia, falta de apetito, cefalea, dolor muscular [29].

En México, el cuadro básico de medicamentos consta de aproximadamente 80 fármacos. De los cuales algunos de ellos son empleados para el tratamiento de los diversos efectos adversos que conlleva el tratamiento de quimioterapia [30].

Debido a los efectos adversos ocasionados por los tratamientos anticancerígenos que disminuyen la calidad de vida del paciente se ha incrementado la investigación para el desarrollo de nuevos fármacos más selectivos y menos tóxicos [31].

Se han desarrollado fármacos que interfieren con cada una de las capacidades adquiridas necesarias para el crecimiento y la progresión tumoral. Además, los medicamentos en investigación se están desarrollando para enfocarse en cada una de las nuevas características de acuerdo con Hanahan (Figura 9).

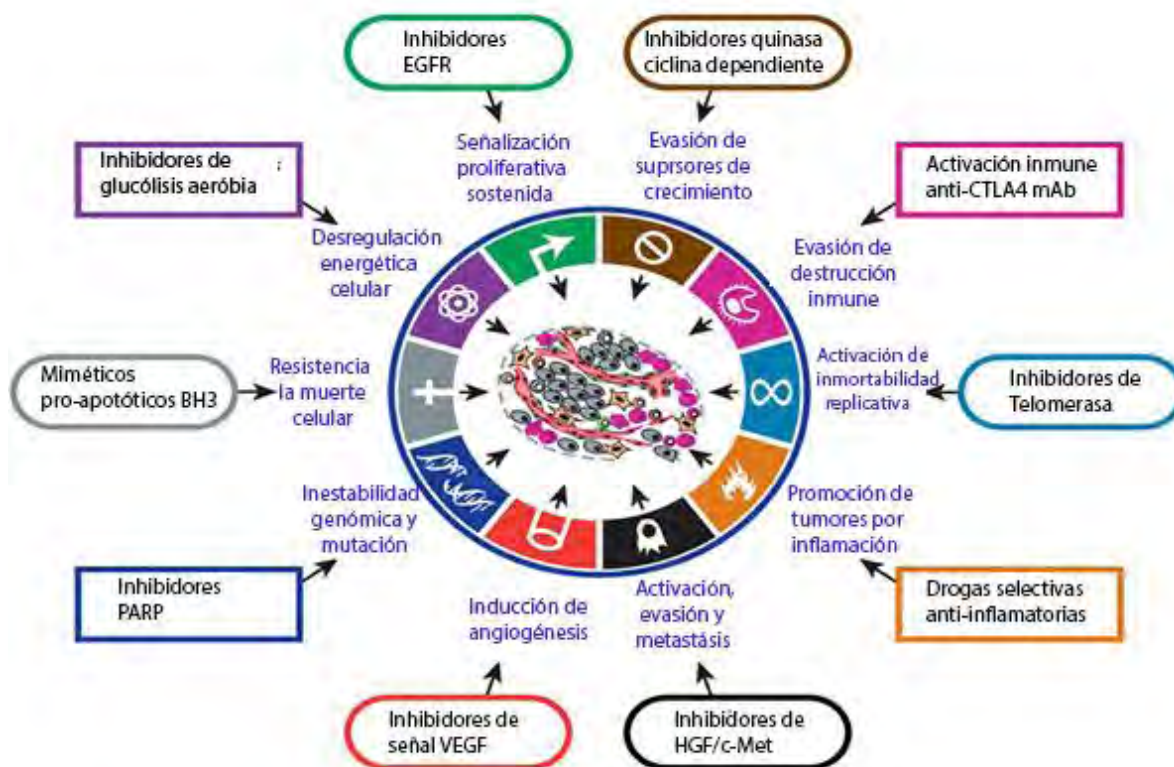


Figura 9. Orientación terapéutica de los blancos moleculares contra el cáncer [18].

En la Tabla 2 se mencionan algunos tratamientos que son aprobados para tumores sólidos y su blanco terapéutico. Algunos blancos terapéuticos son proteínas que juegan un papel importante en las vías de señalización.

La terapia dirigida es conocida por emplear nuevos medicamentos que tienen su efecto sobre ciertas diferencias de las células cancerosas, las cuales les ayudan a crecer y prosperar en el individuo. Ésta es un tipo especial de quimioterapia, en la que el tratamiento actúa sobre genes que promueven el crecimiento, la división y diseminación de células cancerosas [22, 29, 31].



Tabla 2. Algunos fármacos aprobados para el tratamiento de tumores sólidos y su blanco terapéutico [13, 32].

Grupo terapéutico	Fármaco	Blanco de acción	Proceso alterado
Anticuerpos monoclonales	Trastuzumab	Her-2	Amplificación de señal pro-crecimiento
	Cetuximab	EGFR	
	Bevacizumab	VEGF	Angiogénesis
Quimioterapia/ Radioterapia	Múltiple	ADN, complejo mitótico	Angiogénesis, Replicación de ADN, Activación ciclo celular
Terapia endócrina	Tamoxifen	RE	Amplificación de señal pro-crecimiento
	Fulvestrant	RE	
	Inhibidores de aromatasa	Aromatasa	
Moléculas pequeñas	Sunitinib	c-kit, PDGFR, VEGFR	Angiogénesis, Trasmisión de señal pro-crecimiento
	Imatinib	c-kit, PDGFR,	Trasmisión de señal pro-crecimiento
	Lapatinib	Her-2	
	Erlotinib	EGFR	

La mayoría de los fármacos empleados para el tratamiento del cáncer ejercen su efecto al interactuar con el DNA. Estos interfirieren a nivel transcripcional y trasduccional conduciendo a las células a la apoptosis.

El cisplatino [cis-diaminodicloroplatino II] es un compuesto de coordinación metálico con un átomo central de platino, al cual se le uno o varios ligandos. Es empleado en el tratamiento de diferentes cánceres humanos, incluidos el de pulmón, ovario, testicular, entre otros. Su aprobación ante la Administración de alimentos y medicamentos (FDA) se realizó en el año de 1978 [33].

Su actividad anti-tumoral resulta de la modificación del DNA a través de la formación de aductos en la hebra líder, entre (G7-G7 y G7-A7). Los aductos interfirieren con la transcripción y traducción conduciendo posteriormente a una apoptosis celular [34, 35].



El impedimento significativo para un tratamiento exitoso por quimioterapia es la resistencia a múltiples fármacos. La resistencia a agentes anticancerígenos está clasificada como intrínseca (*de novo*) o adquirida [36].

2. Vía de señalización AKT

Uno de los procesos alterados en las células tumorales son las vías de señalización, principalmente las que participan en la proliferación celular. Una vía de señalización se define como un grupo de moléculas que en conjunto controlan una o más funciones de las células, como la división y la muerte celular [1].

Una vez que la primera molécula recibe una señal, ésta activa en cascada a las siguientes moléculas. Dicho proceso sigue hasta que la última molécula se activa y la célula realiza su función [1].

La vía PI3K/AKT/mTOR es central en varias funciones celulares y tiene un complejo mecanismo de transducción de señales, en donde participan las tres proteínas moduladoras principales: PI3K, AKT y mTOR.

Su activación se lleva a cabo por diferentes factores de crecimiento y reguladores. La alteración en algún punto de la vía conlleva a un descontrol en procesos distintivos en el cáncer, como el crecimiento descontrolado, supervivencia celular, competencia metastático, angiogénesis y resistencia a la terapia [37, 38]].

La vía PI3K, AKT y mTOR es considerada única por la interconexión de ésta con otras vías de señalización que controlan procesos importantes en las células (Figura 10) [39].

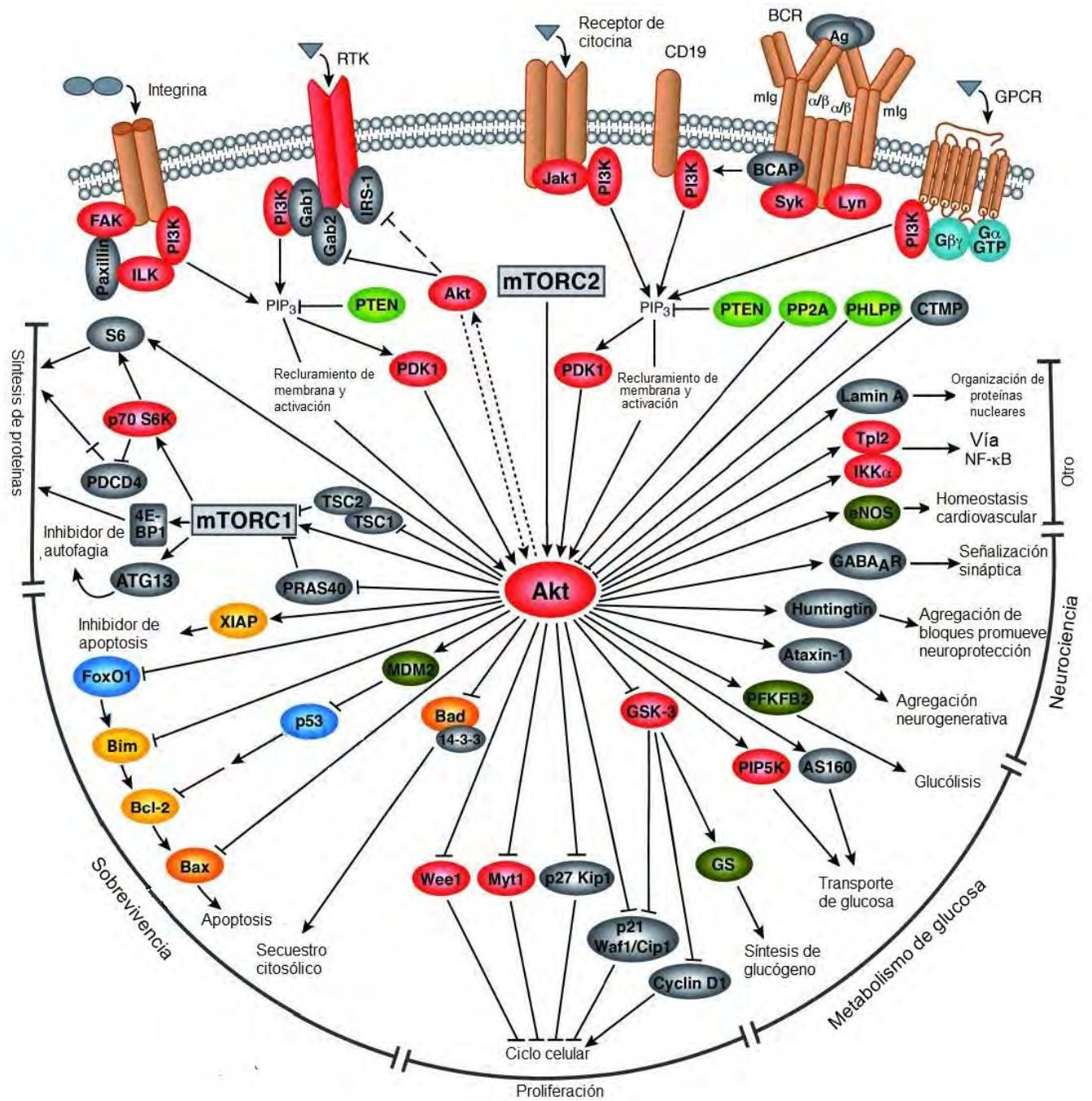


Figura 10. Representación esquemática de la vía de AKT y los efectores posteriores [39].



El estudio de esta vía se basa en la variedad de proto-oncogenes y genes supresores de tumores implicados en la regulación celular que convergen dentro de la misma. Estos mismos controlan varios aspectos en la célula tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [39-43].

Entre sus blancos de interés se encuentran las proteínas quinasas B (PKB) también conocidas como AKT. Las proteínas AKT regulan diversos procesos celulares que incluyen la proliferación celular, crecimiento, tamaño, angiogénesis, respuesta a la disponibilidad de nutrientes e invasión celular [43].

Como se ha comentado anteriormente, uno de los tratamientos contra el cáncer es la terapia dirigida. Dicha terapia es empleada para inhibir el crecimiento, la progresión y la metástasis del tumor al interferir con blancos moleculares específicos. Actualmente está siendo el principal método de desarrollo de fármacos contra el cáncer.

Por lo tanto, el bloqueo de la vía de AKT con apoyo de la terapia dirigida podría impedir la proliferación de las células tumorales induciendo apoptosis [39, 41, 42, 44].

2.1 Proteína quinasas B (AKT)

Las proteínas quinasas son enzimas que regulan el estado de fosforilación de proteínas intracelulares, por lo que tienen alta participación en vías de señalización. La cascada de sucesos de fosforilación resulta en la amplificación y transmisión intracelular de señal [43].



Las proteínas quinasas poseen una gran variedad de sustratos como son proteínas estructurales, enzimas, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción, entre otros. Se han identificado 518 proteínas de este tipo codificadas en el genoma humano (Figura 11). Se caracterizan por unir covalentemente un grupo fosfato, a partir de ATP donador, a residuos de serina, treonina y/o tirosina de sus sustratos [45].

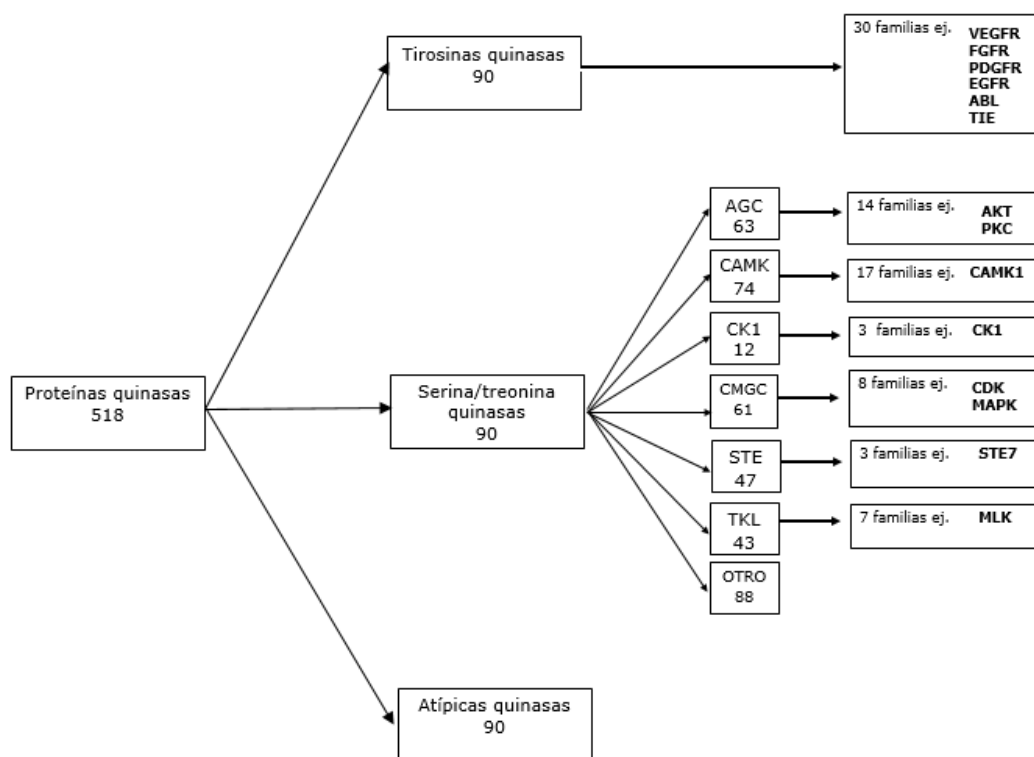


Figura 11. Clasificación de las proteínas quinasas identificadas en el genoma humano. [41].

La proteína AKT, es una serina/treonina quinasa, perteneciente a la familia AGC [40, 44]. De la cual tres isoformas se han identificado: AKT1, AKT2 y AKT3 [41].

Las AKT son intermediarios claves de la vía de señalización que regula varios procesos celulares. Una de las principales funciones de AKT es



promover la supervivencia celular mediada por factores de crecimiento, promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis mediante la inactivación de proteínas pro-apoptóticas [43, 44].

La estructura de las quinasas AKT consiste en tres dominios conservados; i) dominio de homología de pleckstrina (PH) amino terminal; ii) dominio CAT quinasa central; iii) un dominio regulador carboxilo terminal (EXT C-terminal). Entre las isoformas de AKT existe similitudes entre los tres dominios (Figura 12): 80% de similitud con el dominio PH; 90% de similitud con el dominio CAT y 70% de similitud con el dominio EXT C-terminal [38, 43, 44, 46].

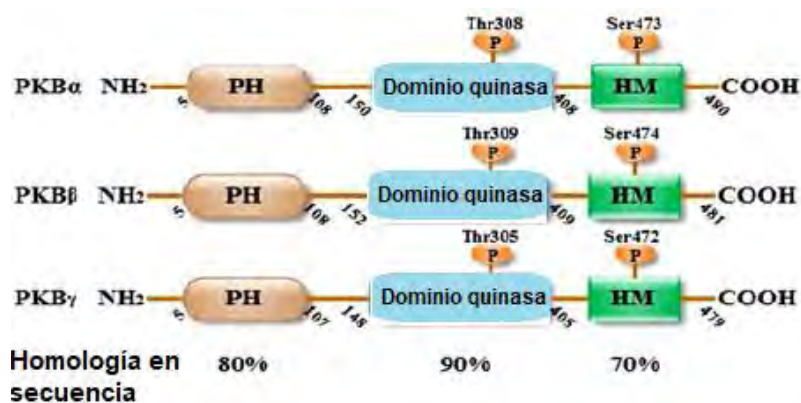


Figura 12. Estructura de los miembros de la familia PKB y el grado de homología entre los dominios: PH (homología de pleckstrina), quinasa central y HM (carboxilo terminal). [46].

2.2 Proteínas AKT y el cáncer

La activación de la ruta AKT juega un papel en el progreso del cáncer al controlar procesos de supervivencia celular como la apoptosis y angiogénesis lo cual permite la proliferación y migración de células. En los



últimos años se ha asociado la resistencia a la terapia (quimioterapia y radioterapia) a la sobreexpresión de alguna ATK [40, 43, 45, 47].

En el año de 1992 se identificaron las primeras alteraciones recurrentes de un gen AKT en cáncer humano, con la demostración de la amplificación y sobreexpresión de AKT2 en un subgrupo de carcinomas ováricos [48]. En Tabla 3 se pueden observar algunos de los intermediarios de la vía de transducción donde participa AKT, el tipo de alteración en el tumor, frecuencia y el tipo de cáncer asociado [38].

Tabla 3. Anormalidades en las vías de señalización relacionadas con PI3/AKT en cáncer. [40].

Molécula	Alteración en el tumor	Frecuencia	Tipo de cáncer
PTEN	Mutación somática	>50%	Glioma, melanoma, próstata, seno.
	Expresión disminuida Metilación Pérdida de heterocigocidad	>50%	Seno, melanoma, próstata, colorrectal, leucemia
	Mutación germinal	80 %	Seno, carcinoma, tiroides
PIK3CA	Amplificación	>50%	Ovario, cérvix, pulmón, seno
	Activación de la mutación	>50%	Vejiga
>25%		Seno	
AKT1	Amplificación	Baja	Estómago
AKT2	Amplificación	Baja	Ovario, páncreas, seno
	Mutación	Baja	Colorrectal
AKT3	Sobreexpresión	Baja	Seno y próstata resistente a hormonas
EGFR	Mutación activadora	10%	Pulmón

Por otra parte, la hiperactividad de las proteínas AKT se ha visto asociada en una variedad de tumores sólidos y malignos resumidos en porcentaje de sobreexpresión de las diferentes isoformas de las proteínas AKT en diferentes tipos de cáncer humano en la Tabla 4 [46].



Solamente en algunos tipos de cáncer se conoce la isoforma de AKT implicada. La sobreexpresión de AKT1 se ha visto implicada a gliosarcoma; AKT2 en cáncer de mama, pancreático y ovárico; AKT3 en cáncer de próstata, mama y se ha sugerido que contribuye en la agresividad de carcinomas insensibles a hormonas esteroides. Se ha sugerido participación de la isoforma AKT2 en la motilidad y consecuente invasión en el organismo de células cancerosas [48].

Tabla 4. Sobreexpresión de AKT en cánceres humanos [48].

Tipo de tumor	% de tumores con AKT activo
Glioma	~ 55
Carcinoma de tiroides	80-100
Carcinoma de mama	20-55
Carcinoma de pulmón de células pequeñas	~60
Carcinoma de pulmón de células no pequeñas	30-75
Carcinoma gástrico	~80
Carcinoma del estroma gastrointestinal	~30
Carcinoma pancreático	30-70
Carcinoma del conducto biliar	~85
Carcinoma de ovario	40-70
Carcinoma endometrial	>35
Carcinoma de próstata	45-55
Carcinoma de células renales	~40
Leucemia mieloide aguda	~70
Mieloma múltiple	~90

La sobreexpresión de AKT en cáncer humano se caracteriza por una activación o supresión de la actividad de varias de las oncoproteínas y supresores tumorales implicados en la señalización celular/regulación metabólica que convergen dentro de la vía de transducción de AKT, sin embargo, no es la única causa de la alteración [39].



Entre los mecanismos de desregulación de la actividad quinasa podemos encontrar:

1. Reordenamiento genético (proteína híbrida)
2. Mutación (regulación activa)
3. Expresión aberrante (activación o desactivación) de la proteína o el ligando.
4. Activación de oncogén
5. Pérdida de gen supresor [41].

2.3 Inhibidores de AKT

Las proteínas AKT pueden estar alteradas en diversos tipos de cáncer. Las isoformas AKT2 y AKT3 son de mayor relevancia clínica por su papel en el cáncer; éstas les proporcionan a las células cancerosas ciertas características como la resistencia a fármacos e invasión a otros órganos.

Entre las características deseables de un inhibidor es tener una elevada selectividad y afinidad por el receptor de interés, esto tomando en cuenta la importancia de la vía en la que participa en estado fisiológico.

La gran homología entre las isoformas de AKT ha sido un factor complicado para la búsqueda de inhibidores selectivos, debido a que difieren en función, distribución tisular y afinidad por ligados.

Pese a esta complicación se han podido diseñar y sintetizar algunos inhibidores por cribado molecular (Figura 13). Los inhibidores para AKT puede ser clasificados como: competitivos de ATP, alostéricos, irreversibles o inhibidores que interactúan con el dominio PH [12, 43, 48, 49].



El blanco terapéutico de la Perifosina es el dominio PH; A-443654 y H-89 son inhibidores competitivos del sitio de unión de ATP, AKTi-1 inhibe a AKT1 y el compuesto A inhibe las tres isoformas de AKT (Figura 13).

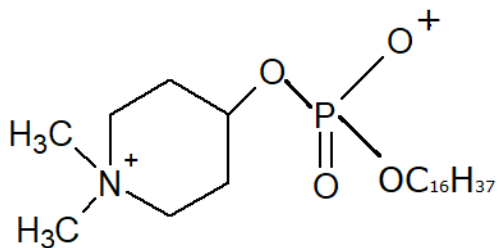
Otros inhibidores de AKT clasificados por mecanismo de inhibición y por su estructura química se presentan en la Tabla 5. Los inhibidores Afuresertib e Ipatasertib se encuentran en evaluaciones clínicas como potenciales inhibidores de AKT en Fase I y II [43].

Tabla 5. Tipos de Inhibidores de AKT [39, 41].

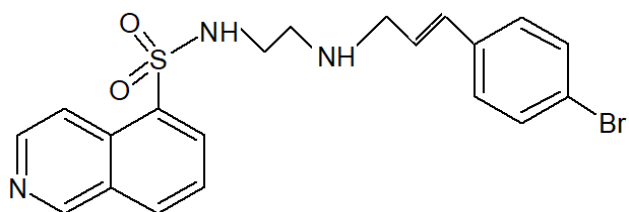
Inhibidor	Objetivo molecular	Mecanismo de acción	Característica estructural
AKTi-1/2	AKT1, AKT2	Inhibidor alostérico	Núcleo 2,3-difenilquinoxalina
AZD5363	AKT, PKA, mTOR	Catalítico, inhibidor competitivo de ATP	Anillos heterocíclicos
Afuresertib	AKT1, AKT2, AKT3	Catalítico, inhibidor competitivo de ATP	Derivados de tiofenocarboxamida
Ipatasertib	AKT	Catalítico, inhibidor competitivo de ATP	Anillos heterocíclicos

El compuesto GSK690693, es un derivado de aminofurazan e inhibidor de AKT de tipo competitivo de ATP. En estudios preclínicos resulto ser un inhibidor potente y selectivo inhibiendo la proliferación celular de diversas neoplasias entre ellas; hematológicas, de mama, ovario y páncreas [42, 50, 51].

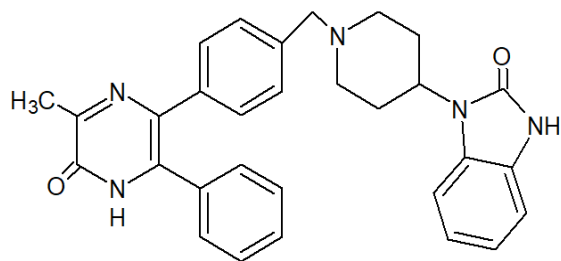
Algunos autores mencionan la disminución de la viabilidad celular y entre su mecanismo de muerte celular la inducción de apoptosis celular. Cabe mencionar que disminuye el número de sustratos fosforilados de la vía PI3K/AKT/mTOR [50, 52].



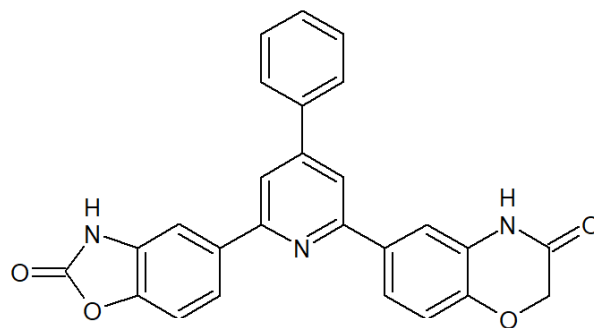
Perifosina



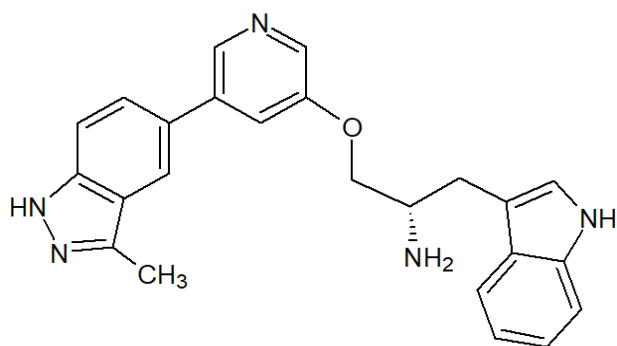
H-89



AKTi-1



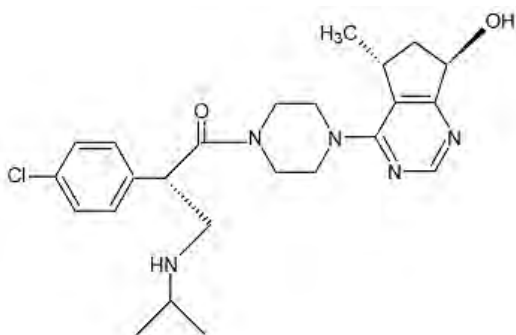
Compuesto A



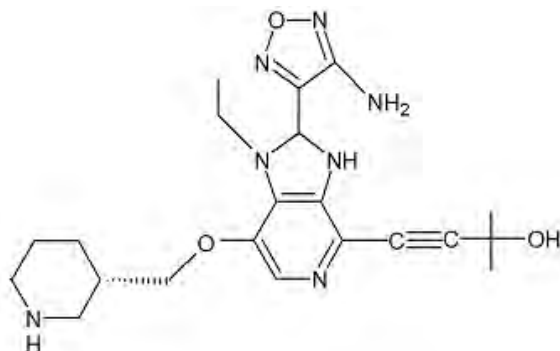
A-443654



Afuresertib



Ipatasertib



GSK690693

Figura 13. Estructuras químicas de inhibidores de AKT [13].



Como se ha mencionado, un problema en el tratamiento del cáncer es la resistencia. Ésta resistencia se puede desarrollar a través de múltiples mecanismos (Figura 14) entre los que se encuentran la reducción de la absorción del fármaco, el aumento en la distribución del fármaco, la evasión de la apoptosis inducida por fármacos, la alteración de proteínas blanco, el secuestro de fármacos, la interacción con moléculas solubles, las interacciones entre células y la matriz extracelular [53, 54].

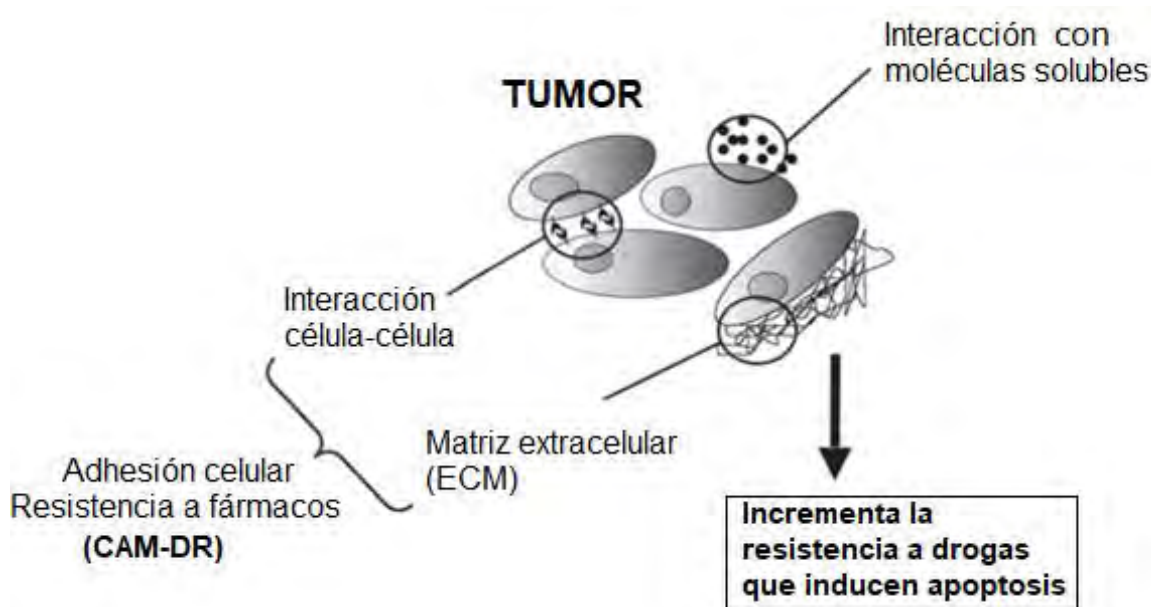


Figura 14. Mecanismo de resistencia a fármacos mediada por el medio ambiente [36].

3. Ensayos de viabilidad celular

Durante la investigación y desarrollo de nuevos fármacos de origen natural o sintético se requiere la determinación del efecto citotóxico y de su bioseguridad. Estos estudios se realizan con la finalidad de monitorear los cambios en la morfología, velocidad de crecimiento, muerte celular y



desintegración celular ocasionadas por la exposición de las células a sustancias biológicamente activas [56].

Por lo tanto, la monitorización de la viabilidad celular (exposición a diferentes tiempos y concentraciones) debe realizarse obligatoriamente para cada compuesto de interés potencial en farmacología experimental, esto se conoce como pruebas de viabilidad celular [55-57].

Estas pruebas permiten evaluar la viabilidad celular a través de la permeabilidad de la célula, su actividad metabólica, producción de ATP o actividad enzimática. Entre los métodos empleados se encuentra el ensayo de MTT presentado en 1983 por Mosmann.

El método de MTT se emplea para la medición *in vitro* de la viabilidad metabólica de cultivos celulares sometidos a diferentes condiciones de cultivo, por lo que permite evaluar la citotoxicidad de algún compuesto [58, 59].

Es de los métodos de evaluación *in vitro* mayormente empleado para evaluar la citotoxicidad por ser un ensayo rápido, económico, versátil, de simple metodología, cuantitativo y preciso [60, 61].

La evaluación implica una actividad enzimática oxidorreductasa celular dependiente de NAD⁺. La reacción transforma de soluble el tetrazolio MTT bromuro de [3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio] en insoluble (E, Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano o formazan (Figura 16) [61].

El formazan se puede disolver con dimetilsulfóxido (DMSO) para dar un color púrpura con absorción característica a una longitud de onda de 540 nm que se puede determinar con apoyo de un lector de placas. La



intensidad del color púrpura es directamente proporcional al número de células y, por lo tanto, indica la viabilidad celular [56, 60, 62].

La sal de tetrazolio es color amarillo en polvo y en solución. El producto formado tras la reducción enzimática es color púrpura e insoluble en agua. En un inicio su metodología incluía la dilución de los cristales de formazan en solución etanol-ácido. Sin embargo se cambió el disolvente por uno menos polar (Dimetilsulfóxido) para aumentar la solubilidad de los cristales y facilitar su lectura en placa [56, 58, 61, 62].

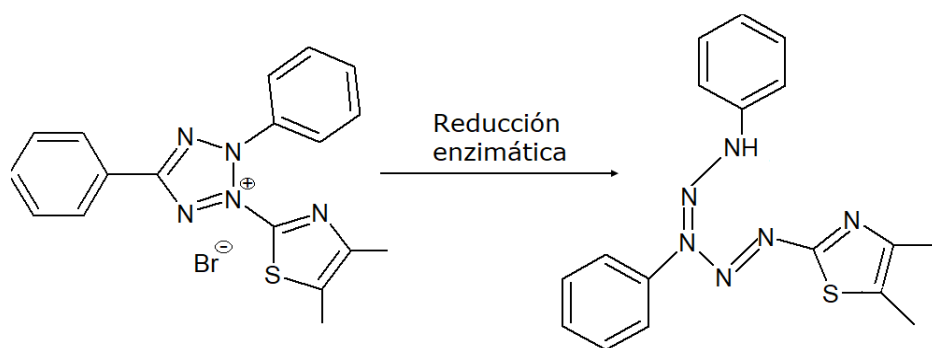


Figura 15. La reducción de MTT a formazan en células vivas [60]

La capacidad de las células para reducir el MTT a formazan constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. Los resultados se expresan en porcentaje de células vivas.

La curva de concentración-respuesta se calcula teniendo en cuenta el intervalo de las concentraciones utilizadas versus el porcentaje de la reducción del crecimiento celular correspondiente. A partir de la curva se calcula la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀); concentración que inhibe el 50 % del crecimiento celular



Estudios indican que el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) es responsable de la mayoría de la reducción de MTT. Desde las primeras aplicaciones del método se ha considerado que el MTT se reduce por la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales (succinato deshidrogenasa) en células vivas. Sin embargo, la reducción no sólo se asocia con mitocondrias, sino también con el citoplasma, membranas no mitocondriales (endosoma y lisosoma), las deshidrogenasas de la membrana plasmática e inclusive fosfolípidos tisulares [57, 60, 63, 64].



4. JUSTIFICACIÓN

El incremento en el número de nuevos casos y el número de muertes por cáncer ha posicionado a ésta enfermedad como la segunda causa de muerte a nivel mundial. Para el año 2030 se estima que el número de muertes incremente a 13 millones.

Debido a la falta de selectividad de fármacos, sus efectos adversos, los efectos de resistencia y los altos costos, se ha incrementado la búsqueda de nuevas opciones para el tratamiento de distintitos tipos de cáncer.

La estrategia que se ha empleado en los últimos años es el diseño de fármacos dirigidos a un blanco terapéutico, con la finalidad de aumentar la eficacia de los anticancerígenos y reducir los efectos adversos.

Uno de los blancos que ha sido mayormente considerado por su papel en diversas vías de señalización, las cuales son fundamentales para la regulación del metabolismo, crecimiento, proliferación y apoptosis son las proteínas quinasas; principalmente proteína quinasa B (PKB) o también conocida como AKT.

Uno de los objetivos de la investigación farmacéutica es la búsqueda de nuevas estructuras con actividad efectiva, en este caso antineoplásica. En el laboratorio 122 del Conjunto D en el proyecto 251807 de CONACYT se identificaron y diseñaron *in silico* derivados de piridina 2,4,6-trisustituidas como potenciales inhibidores de AKT quinasa, obteniéndose series de compuestos con un núcleo novedoso [44].

Por lo anterior, la búsqueda de nuevos blancos tiene como objetivo el desarrollo de moléculas que tengan actividad biológica, principalmente en células cancerosas, y puedan ser empleadas en diferentes tipos de cáncer.



5. HIPÓTESIS

Los derivados de piridinas al ser diseñados *in silico* y sintetizados como inhibidores de AKT presentarán actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Evaluar la actividad citotóxica de derivados de piridinas 2, 4, 6-trisustituidas en diferentes líneas celulares de cáncer.

6.2 Particulares

- Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos que sean solubles en dimetilsulfóxido (DMSO), a una concentración de 50 μM mediante el ensayo espectrofotométrico de MTT.
- Identificar cuáles compuestos de las series en estudio presentan actividad citotóxica significativa.
- Determinar la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los compuestos que presentan la mayor actividad biológica.



7. MÉTODO EXPERIMENTAL

7.1 Reactivos

Tween 80 (Sigma-Aldrich®), Dimetilsulfóxido (DMSO, Honeywell®), GSK690693 (HPLC, Sigma-Aldrich®), cis-diaminodicloroplatino II o cisplatino (1 mg/mL, Blastolem®RU), bromuro 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)2,5 difeniltretazolio, Sigma-Aldrich®).

Compuestos derivados de piridinas trisustituidas sintetizadas en el Laboratorio 122, Conjunto D de la Facultad de Química en el proyecto 251807 de CONACYT

Tabla 6. Derivados de piridinas trisustituidas evaluadas en este trabajo en líneas celulares.

Serie 1	Serie 2	Serie 3	
S1-2	S2-1	S3-1	S3-9
S1-3	S2-5	S3-2	S3-11
S1-4	S2-6	S3-3	S3-15
S1-5	S2-8	S3-5	S3-16
S1-6	S2-9	S3-6	S3-17
S1-8	S2-11	S3-7	S3-19
S1-9	S2-16	S3-8	S3-19

7.2 Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas empleadas se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC), las cuales se mencionan a continuación: HeLa de cáncer de cérvix, SW-620 de cáncer de colón, SK-LU-1 de cáncer de pulmón, MDA-MB-231 de cáncer de mama y PC-3 de cáncer de próstata, éstas fueron conservadas a -70°C hasta su uso.



Las líneas celulares fueron cultivadas en condiciones de esterilidad en medio Dulbecco´s Modified Eagle Medium, DMEM (Biowest®). Para la línea PC-3 se utilizó el medio RPMI 1640 (Biowest®). Ambos medios de cultivo fueron suplementados con aminoácidos, piruvato de sodio, antibiótico-antimicótico y suero fetal bovino (SFB) al 10% e incubados a 37 °C, 90% de humedad y 5% de CO₂ (condiciones estándar de cultivo).

La siembra de células se realizó en placas de 96 pozos en un volumen **total por pozo de 200 µL**. La cantidad de células dependió del tiempo de exposición a la cual sería evaluado (Tabla 7).

Tabla 7. Número de células empleadas en ensayos de viabilidad dependiendo de la duración del tratamiento.

Línea celular	# de células (48 h)	# células (72 h)
HeLa	5500	4000
SW-620	5500	4000
SK-LU-1	5500	4000
MDA-MB-231	5000	3500
PC-3	5000	3500

7.3 Tratamiento

Una vez sembradas las células en las placas de 96 pozos se incubaron por 24 h a condiciones estándar de cultivo. Posteriormente fueron expuestas a cada compuesto en un intervalo de concentraciones.

La mayor concentración para cada compuesto correspondía a aquella donde el volumen de DMSO final en el pozo no fuera mayor a 0.28 % (Anexo A), a partir de la cual se realizó una dilución (1:2). Una vez realizado el tratamiento se incubó bajo condiciones estándar de cultivo en el tiempo respectivo de evaluación.



7.4 Determinación de la viabilidad celular

Para la evaluación de la actividad biológica de los compuestos se empleó el método de MTT. Una vez concluido el tiempo de exposición se añadió a cada pozo **20 µL de solución MTT** a una concentración de 2.5 mg/m.

Posteriormente se incubaron las cajas por un tiempo de 90 minutos a condiciones estándar. Para la lectura de las placas los cristales de formazan se disolvieron con 200 µl de DMSO.

La lectura óptica de las placas se realizó en el equipo EPOCH 2 Microplate Reader (Biotek®) a 540 nm.

Finalmente, la viabilidad celular se determinó mediante la comparación de los pozos tratados con los compuestos de interés contra el vehículo (blanco) al cual se le asignó una viabilidad del 100 %. El cálculo de la viabilidad se realizó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{(\text{Abs problema})}{(\text{Abs control})} * 100$$

7.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el programa GraphPad Prism 7.0. Para la determinación de la citotoxicidad generada por los compuestos de las series de piridinas se realizaron comparaciones de medias mediante ANOVA de una vía con una prueba posthoc Tukey con un $\alpha=0.0$



8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para las evaluaciones de la actividad citotóxica se emplearon líneas celulares de diferentes tipos de cáncer. Dichas líneas celulares representan algunos de los cánceres de mayor incidencia a nivel mundial y presentan una hiperactividad de AKT [5, 12, 22, 65, 66].

8.1 Actividad citotóxica de cisplatino

Con el objetivo de observar la respuesta positiva a un fármaco antineoplásico y proseguir a las siguientes determinaciones se realizó la exposición al compuesto cisplatino o cis-diaminodicloroplatino II.

El cisplatino es un compuesto de coordinación metálico empleado en el tratamiento de diferentes cánceres humanos, incluidos el de pulmón, ovario, testicular, entre otros. Su actividad anti-tumoral resulta de la modificación del DNA a través de la formación de aductos en la hebra líder interfiriendo con la transcripción, traducción y posterior apoptosis celular [33-35, 51, 67].

En la Tabla 8 se presentan los valores de CI_{50} calculados a 48 y 72 h de exposición con cisplatino. Como se puede observar los valores de CI_{50} a 72 h son menores comparados con los de 48 h, debido a que a mayor exposición se presenta una menor viabilidad celular y por lo tanto menor CI_{50} . Los resultados muestran una diferencia significativa entre el control y los tiempos de exposición al compuesto.



Tabla 8. Valores de CI_{50} calculadas para el compuesto cisplatino en las líneas celulares empleadas a 48 y 72 h de tratamiento.

Línea celular	CI_{50} a (48 h)	CI_{50} a (72 h)
HeLa	$18.5 \pm 3.0^*$	$9.8 \pm 3.2^*$
SW-620	$21.1 \pm 6.2^*$	$12.4 \pm 2.3^*$
SK-LU-1	$12.0 \pm 2.5^*$	$10.9 \pm 4.5^*$
MDA-MB-231	$25.0 \pm 4.8^*$	$20.2 \pm 3.6^*$
PC-3	ND	$7.9 \pm NA$

Los valores indican concentraciones micromolares de al menos una $n=3 \pm EEM$.

ND: No determinado. *Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.*

Al comparar los resultados con los de la Tabla 9, cuyos resultados han sido reportados en anteriores investigaciones, se observa que las CI_{50} de las líneas celulares HeLa, SK-LU-1 y PC-3 son similares.

Por lo tanto, los resultados anteriores confirman una respuesta citotóxica a un fármaco antineoplásico en las líneas celulares por lo que pueden ser empleadas en las siguientes determinaciones [65, 68-71].

Tabla 9. Valores de CI_{50} de cisplatino en diferentes líneas celulares a 72 h de tratamiento

Línea Celular	* CI_{50} (μM)
HeLa	9.6 ± 0.8
SW-620	17.0 ± 0.2
SK-LU-1	7.1 ± 0.2
PC-3	4.6 ± 1.9

*Los valores indican concentración de al menos tres experimentos. $n \pm EEM$.

A pesar del gran avance en la terapia contra el cáncer se siguen buscando alternativas que sean más seguras y eficaces para el paciente, que mejoren su calidad de vida con una disminución de efectos adversos. Por



lo cual, con ayuda de la terapia dirigida se busca la inhibición de AKT, crucial en la reproducción celular por su función de inhibición o activación de factores de crecimiento o pro-apoptóticos. Lo anterior hace a la AKT un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos [40]

En la Figura 16 se presentan las estructuras generales de cada serie de piridina. Se puede apreciar que la **Serie 1** y **Serie 2** de piridinas tienen una simetría estructural en la posición 2 y 6 con la finalidad de una mayor interacción con el sitio de ATP. Mientras que la modificación en la posición 4 se realizó para aumentar la estabilidad de los compuestos como lo menciona Trejo y colaboradores (2017), y es en esta posición donde las diferentes sustituciones originan a las dos series de piridinas [44].

El descubrimiento de fármacos resulta ser un proceso complejo y costoso por lo que en los últimos años se ha recurrido al apoyo de métodos computacionales (también llamados *in silico*) para acelerar dicho proceso y con ello disminuir costos.

Dichas técnicas han ayudado al descubrimiento de nuevas entidades químicas, pero ignoran los problemas de absorción y biodisponibilidad por una baja solubilidad. Debido a que el proceso de búsqueda *in silico* se trata de optimizar la estructura con las propiedades del sitio de unión, origina compuestos con alto peso molecular y lipofílicos, por lo tanto, poco solubles en medios acuosos [72, 73].

La baja solubilidad fue observada en algunos de los compuestos de la **Serie 1** y la **Serie 2** de piridinas disueltos en el vehículo mientras que en el medio de cultivo se observó para las tres series.

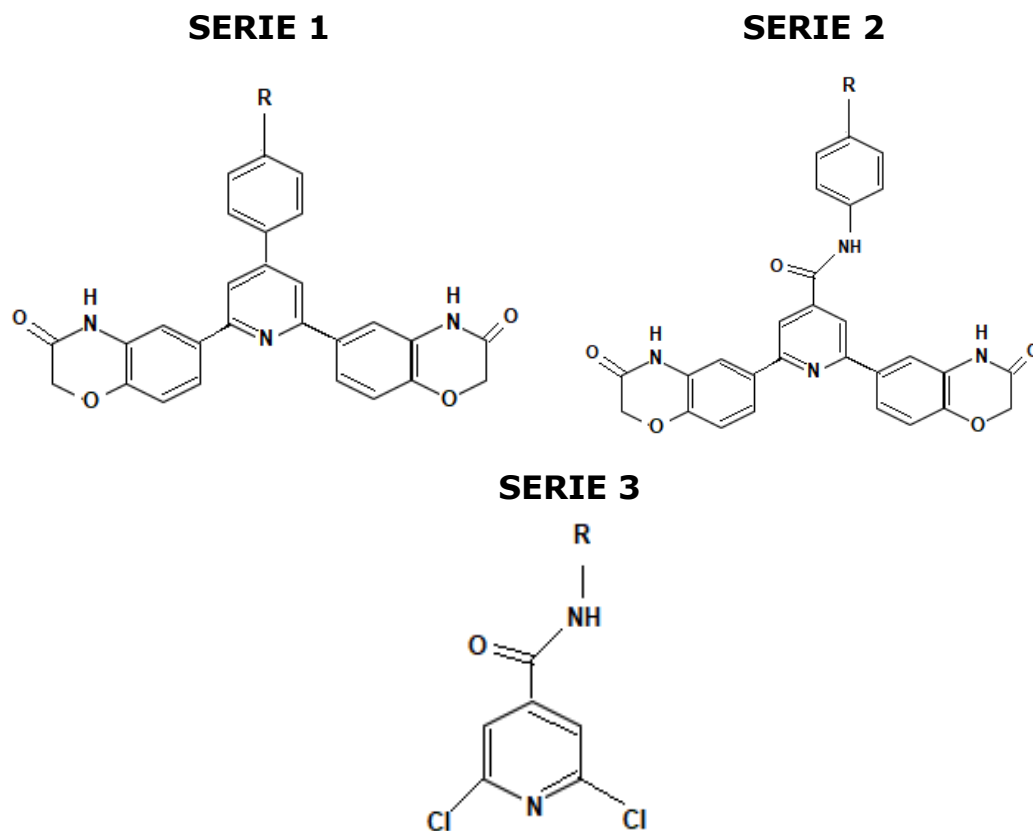


Figura 16. Estructuras generales de las series de piridinas 2, 4, 6-trisustituidas.

Por lo que para realizar la evaluación de los compuestos se consideró la solubilidad en DMSO. De un total de 35 compuestos se descartaron aquellos que fueron insolubles quedando para el análisis *in vitro* siete compuestos la **Serie 1**, para la **Serie 2** la misma cantidad y trece compuestos de la **Serie 3** cuyos resultados se presentan a continuación.



8.2 Citotoxicidad de la serie 1 de piridinas

Una primera determinación de la actividad citotóxica de los compuestos de la **Serie 1** se realizó a una concentración de 50 μM . Ello con el objetivo de identificar a aquellos compuestos que provocaran una disminución en la viabilidad celular significativa.

En la Figura 17 y 18, se observan los resultados de la **Serie 1** de piridina, la cual se expuso a: 48 y 72 h. De este análisis se identificaron tres compuestos con una citotoxicidad significativa en las líneas celulares, por lo que se continuó con la siguiente evaluación.

Dicha evaluación consistió en la exposición a diferentes concentraciones para el posterior cálculo de CI_{50} . Al microscopio se pudo observar precipitación de los compuestos, por lo que confirma su baja solubilidad en medio acuoso (Anexo B).

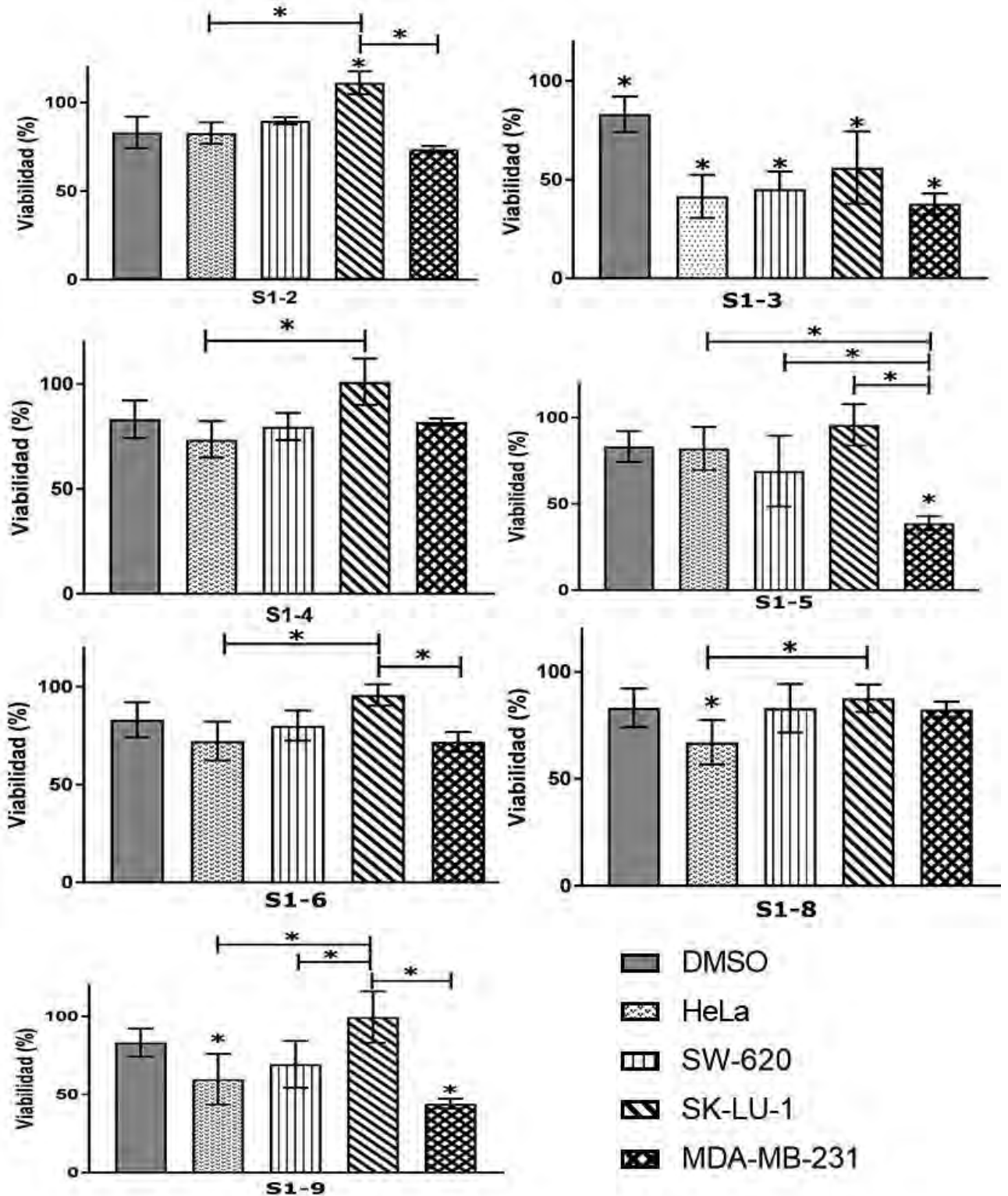


Figura 17. Viabilidad de las líneas celulares expuestas a piridinas de la **serie 1** a una concentración de 50 μM a 48 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.

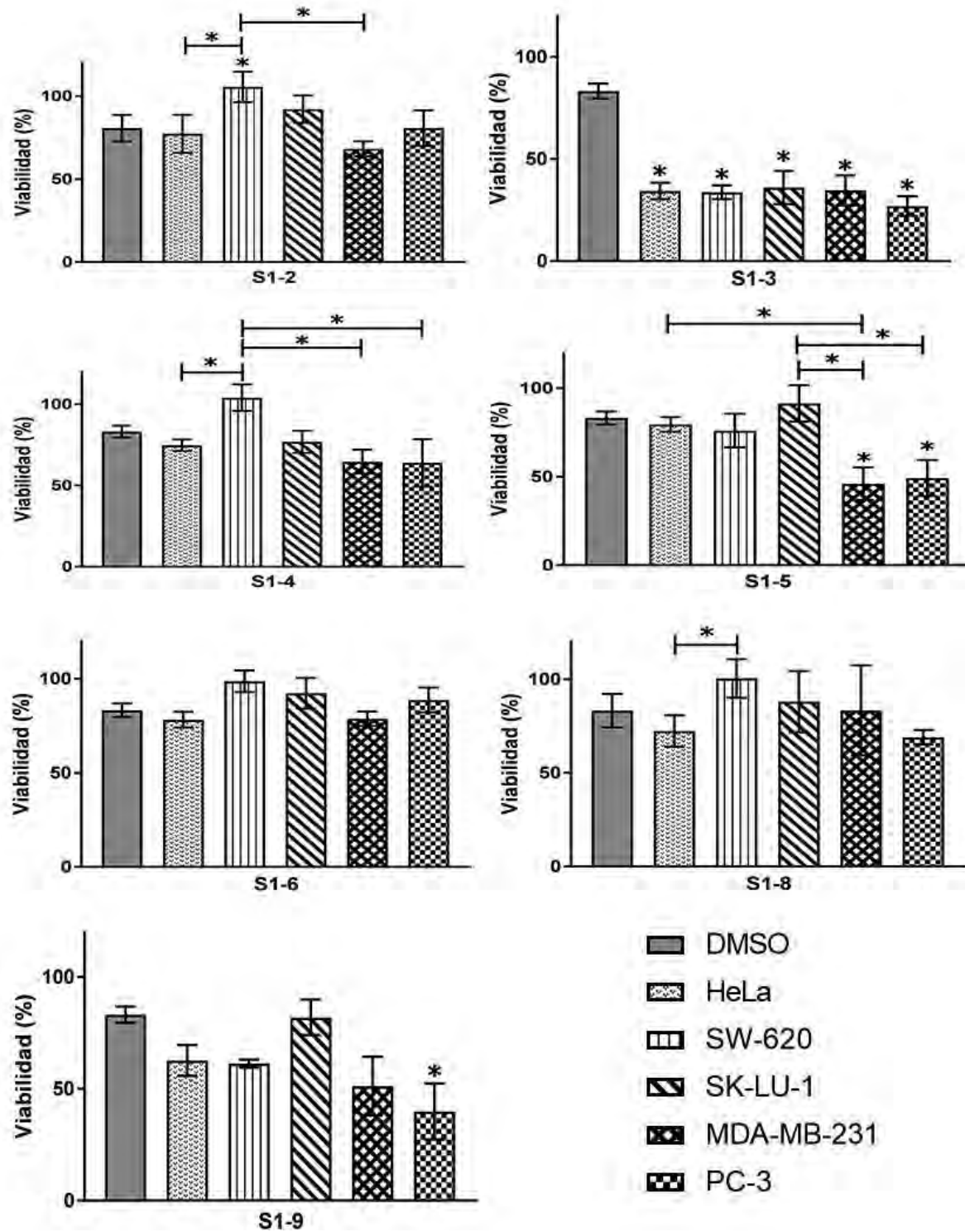


Figura 18. Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la **serie 1** a una concentración de 50 μM a 72 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.



8.3 Citotoxicidad del compuesto S1-3

El primer compuesto con efecto citotóxico significativo fue **S1-3** cuya concentración máxima evaluada fue de 53.81 μM . En la Figura 19 se ejemplifica el comportamiento de la viabilidad en función de la concentración de **S1-3** donde es posible realizar un cálculo de CI_{50} por una regresión no lineal, usando el software OriginPro 7[®].

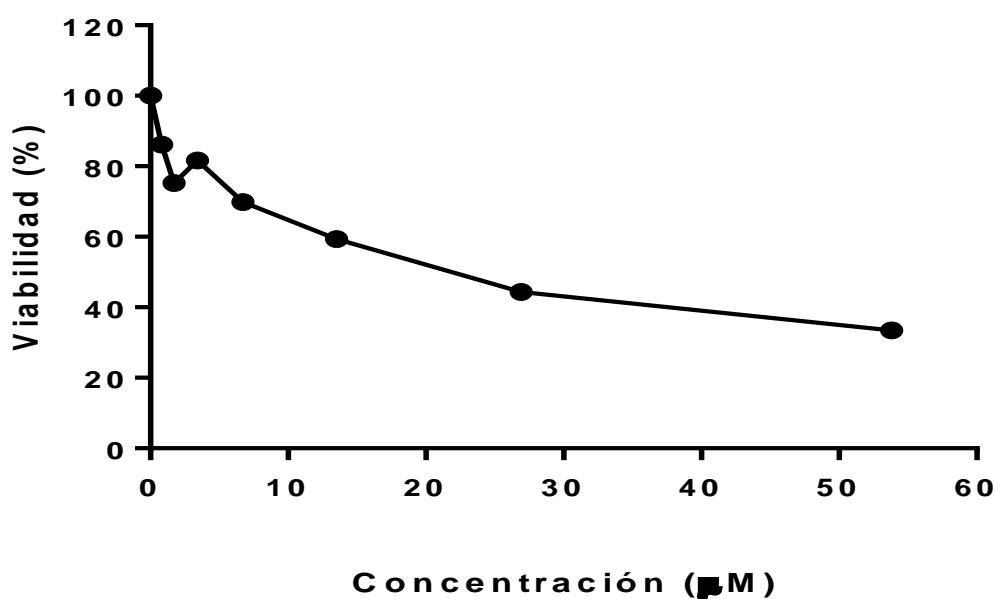


Figura 19. Viabilidad de la línea celular HeLa expuesta a la piridina **S1-3** a diferentes concentraciones a 72 h (n=1).

En la Tabla 10 se observa que los compuestos únicamente tuvieron una actividad citotóxica considerable en uno de los dos tiempos de exposición evaluados. Siendo posible un sólo cálculo de CI_{50} para cada línea celular de estudio.

Se puede afirmar que el compuesto **S1-3** es más citotóxico en la línea celular PC-3, esto al tener un valor de CI_{50} menor que el resto de las líneas celulares.



Por otro lado, este compuesto es menos citotóxico sobre la línea MDA-MB-231 al tener un valor de CI_{50} mayor que el resto de las líneas celulares.

Tabla 10. Valores de CI_{50} calculadas para el compuesto **S1-3** a 48 y 72 h de tratamiento.

Línea celular	CI_{50} (48 h)	CI_{50} (72 h)
SW-620	14.2 ± 1.8	ND
SK-LU-1	21.4 ± 0.6	ND
MDA-MB-231	21.2 ± 9.0	ND
HeLa	ND	12.7 ± 1.4
PC-3	ND	6.2 ± 0.9

* Los valores indican concentraciones micromolares. $n \geq 3 \pm EEM$.

ND: No determinado

8.4 Citotoxicidad del compuesto S1-9

El siguiente compuesto de la **Serie 1** que presentó un efecto de citotoxicidad significativa fue **S1-9**. Este tuvo una actividad citotóxica en tres de las cinco líneas celulares de estudio de las cuales se logró calcular el valor de CI_{50} .

En la Tabla 11 se puede observar que el compuesto **S1-9** presentó un comportamiento similar al observado para el compuesto **S1-3** en las líneas celulares MDA-MB-231 y PC-3.

Es decir, el compuesto **S1-9** tuvo el valor de CI_{50} más alto en la línea celular MDA-MB-231, seguido de la línea celular HeLa. Por otra parte, el valor de CI_{50} más bajo se obtuvo en la línea celular PC-3.



Tabla 11. Valores de CI_{50} calculadas para el compuesto **S1-9** a 72 h de tratamiento.

Línea celular	CI_{50}
Hela	26.2 ± 1.6
MDA-MB-231	32.4 ± 1.6
PC-3	11.6 ± 4.9

*Los valores indican concentraciones micromolares de $n \geq 3$ o más \pm EEM.

En la Figura 20 se muestra el comportamiento del compuesto **S1-9** en las dos líneas celulares SW-620 y SK-LU-1, en donde el valor de CI_{50} no fue posible determinar. El comportamiento al tiempo máximo de exposición no indujo una disminución considerable de la viabilidad celular.

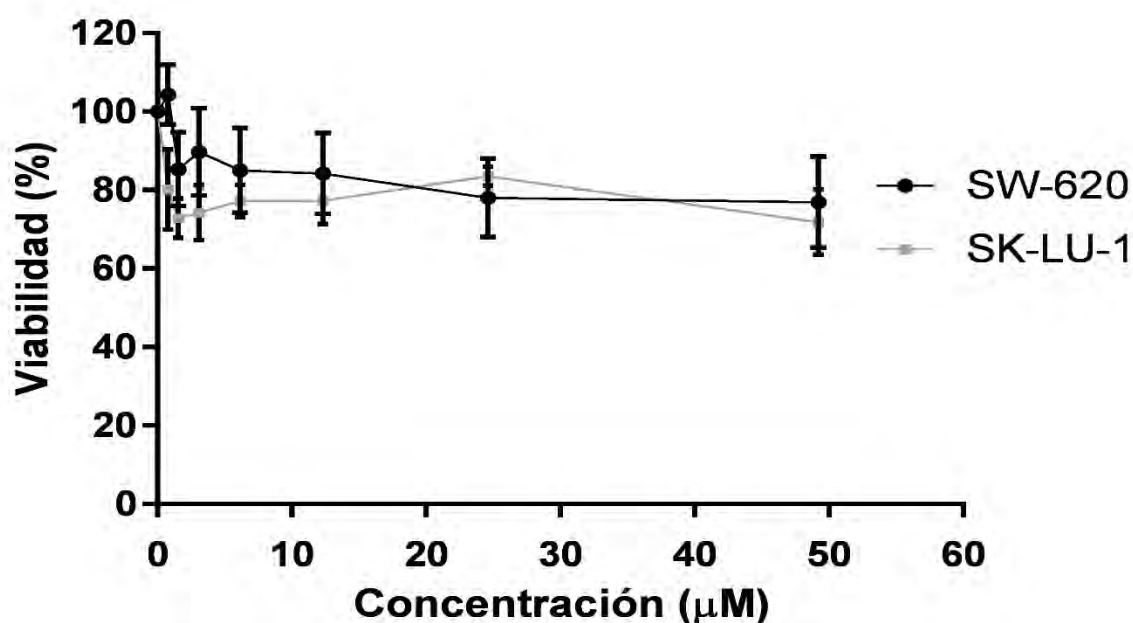


Figura 20. Viabilidad de las líneas celulares SW-620 y SK-LU-1 expuestas a la piridina **S1-9** a diferentes concentraciones a 72 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.



8.5 Citotoxicidad del compuesto S1-5

En cuanto al compuesto **S1-5** se observó que a 50 μM induce una citotoxicidad considerable en dos de las líneas celulares de estudio; MDA-MB231 y PC-3.

Sin embargo, al realizar el análisis posterior del compuesto a diferentes concentraciones se observó una pérdida en la actividad citotóxica y no se logró calcular una CI_{50} en PC-3 y en MDA-MB-231 (Figura 21). Con este hecho se puede sugerir que para este compuesto la estabilidad disminuye y con ello disminuye su citotoxicidad.

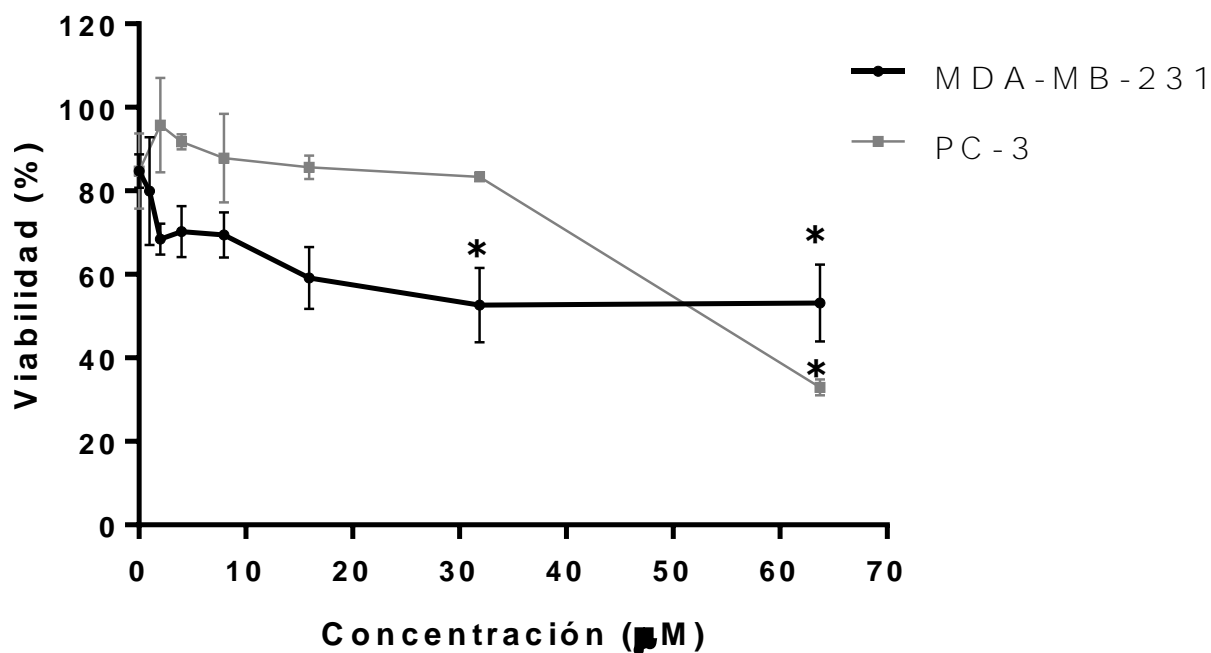


Figura 21. Viabilidad celular de la línea MDA-MB-231 y PC-3 expuesta con la piridina **S1-5** a 72 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.



8.6 Citotoxicidad de la serie 2 de piridinas

Siguiendo el estudio con la **Serie 2** de piridinas se realizó el mismo análisis inicial a la serie de compuestos a 50 μM en ambos tiempos de exposición y se determinó si alguno induce una disminución significativa de la viabilidad celular.

Como se observa en la Figura 22 y 23, varios compuestos de esta serie presentaron citotoxicidad baja y ninguno ocasionó disminución significativa de la viabilidad. Por lo anterior, no se realizó la evaluación a diferentes concentraciones para poder determinar los valores de CI_{50} en alguna línea celular.

En cuanto a la observación al microscopio, todos los compuestos evaluados a una concentración de 50 μM presentaron precipitados en el medio de cultivo. Esta observación se puede atribuir a la complejidad estructural y los grupos hidrofóbicos que presentan los compuestos de esta serie de piridinas lo cual, evidentemente limitó su actividad biológica (Anexo B).

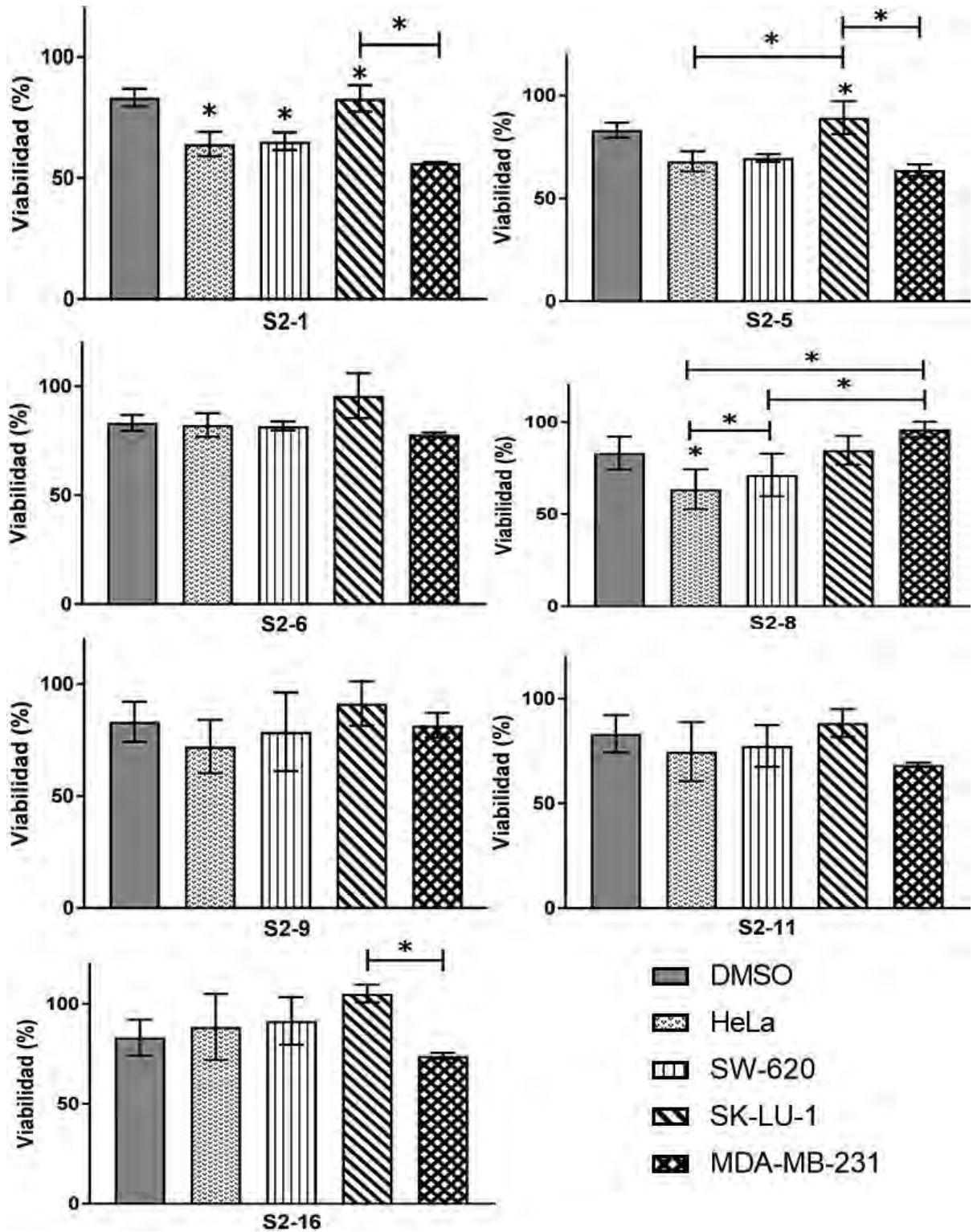


Figura 22. Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la **Serie 2** a una concentración de 50 μM a 48 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.

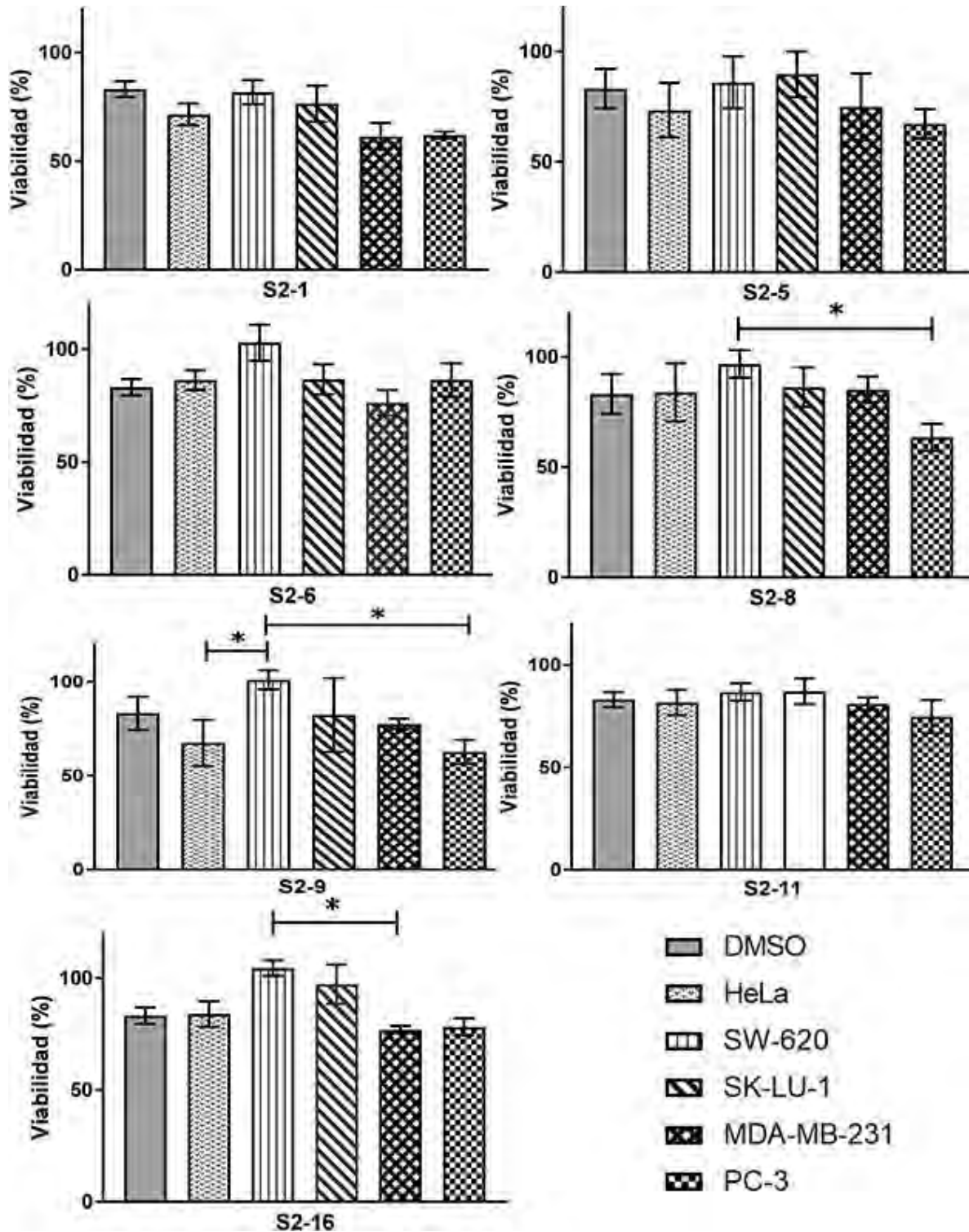


Figura 23. Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la serie 2 a una concentración de 50 μ M a 72 h de tratamiento. Resultados procesados con GradPhad Prism 7.0 mediante ANOVA con $\alpha < 0.05$.



8.7 Citotoxicidad de la serie 3 de piridinas

En lo que respecta con la **Serie 3** y al igual que a las anteriores series de piridinas, se realizó un experimento inicial con una concentración de 50 μ M para todos los compuestos, con una exposición de 48 y 72 h en las líneas celulares de estudio.

Con resultados preliminares, en la Figura 24 se puede observar que seis de los compuestos de esta serie presentaron una actividad citotóxica significativa por debajo del 50%. Los resultados se observaron a las 48 h. Sin embargo, al ser más notoria la respuesta de las líneas celulares a las 72 h, se decidió realizar el estudio de los compuestos a diferentes concentraciones en este tiempo de exposición.

Posterior al estudio, se realizó el cálculo de la CI_{50} de los compuestos de la misma manera que las dos series anteriores. Se debe señalar que los resultados presentados en la Tabla 12 son preliminares, por lo que se tiene que realizar más repeticiones experimentales para corroborar los resultados y actividad de los compuestos.

Tabla 12. Valores preliminares de CI_{50} de la **Serie 3** de piridinas a 72 h de tratamiento.

Línea celular	S3-2	S3-3	S3-5	S3-8	S3-11	S3-15
HeLa	24.6	6.4	>100.0	15.8	11.7	>100.0
SW-620	23.9	4.5	18.0	10.8	2.9	>100.0
SK-LU-1	36.7	7.3	21.6	16.0	3.0	24.8
MDA-MB-231	45.0	9.9	ND	>100.0	5.1	ND
PC-3	26.9	9.2	>100.0	ND	2.1	ND

* Los valores indican concentraciones micromolares de $n=1$.

ND= No determinado

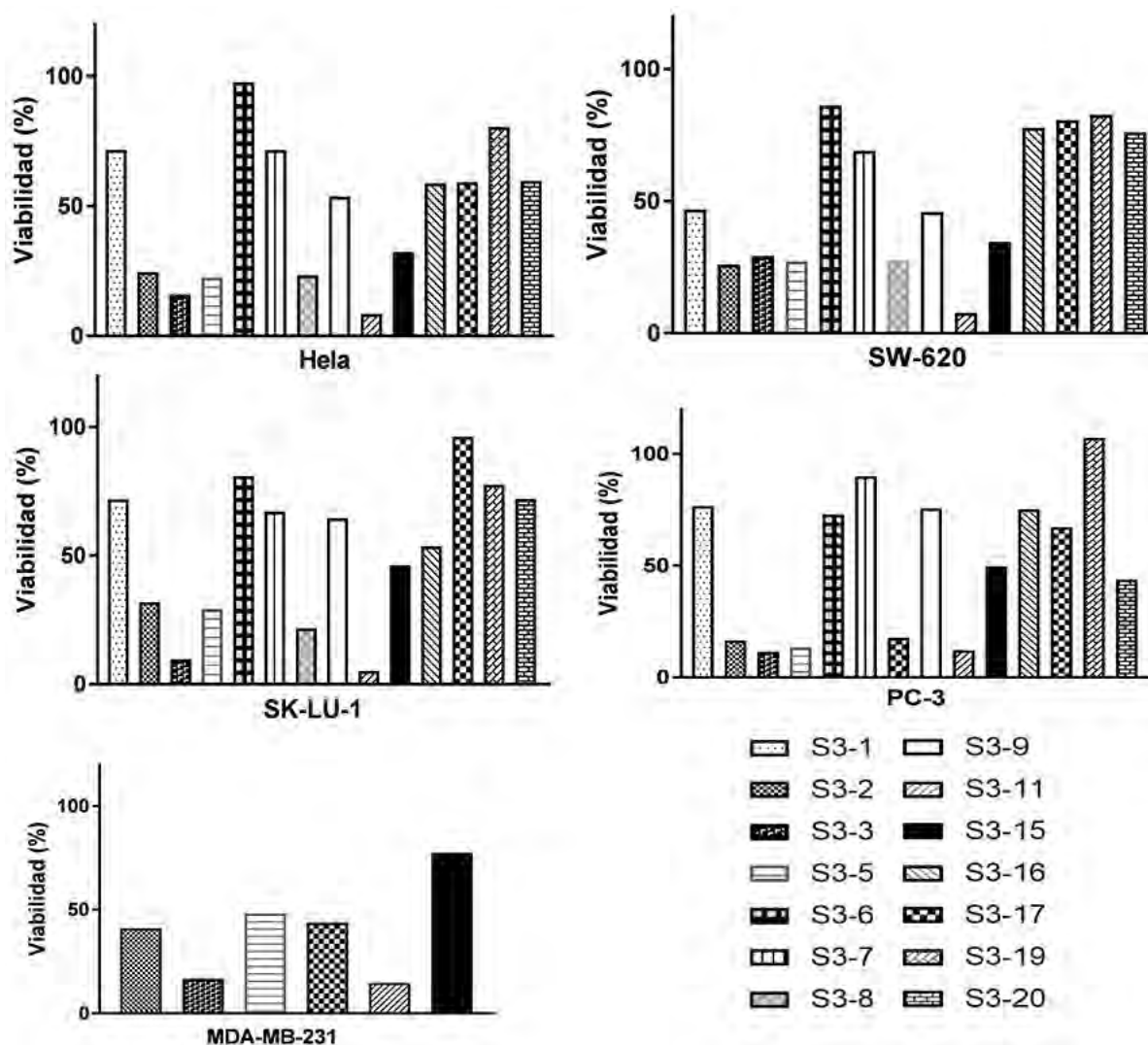


Figura 24. Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas a piridinas de la **serie 3** a una concentración de 50 μM a 72 h de tratamiento. n=1

Al comparar esta serie con la **Serie 1** y **2** se puede observar una complejidad estructural menor y una cantidad mayor de sustituyentes hidrofóbicos, lo cual hace a esta serie de piridina más soluble en DMSO.

Al igual que las dos series de piridinas anteriores se pudo observar al microscopio cristales del compuesto a la máxima concentración, con un intervalo de concentración de 81-126 μM , en orden descendiente de



concentración (Anexo A). Cabe mencionar que a la concentración de 50 μM se observaron dichos cristales en los compuestos **S3-3**, **S3-9**, **S3-15**, **S3-16** y **S3-20** (Anexo B).

Debido al problema de solubilidad que presentaban los compuestos se buscó una alternativa de vehículo para el análisis. Uno de los vehículos empleados en pruebas de actividad biológica es el Tween 80.

8.8 Citotoxicidad de Tween 80

El Tween 80 también conocido como polisorbato 80 o monooleato de sorbitán polioxietileno se utilizó al ser un tensoactivo no iónico ampliamente usado en cosméticos, productos farmacéuticos y alimentos. El Tween 80 es empleado como agente solubilizante en líneas celulares con la finalidad de mejorar la solubilidad de fármacos [74-77].

En busca de mejorar la solubilidad de los compuestos se empleó este tensoactivo. Primeramente, se evaluó su citotoxicidad en algunas de las líneas celulares. Los valores de CI_{50} se presentan a continuación, los cuales resultaron ser valores muy bajos.

En la Tabla 13 se presentan los resultados preliminares de las CI_{50} calculadas. Se puede observar que los valores son muy bajos. Para confirmar la toxicidad que presenta el disolvente Tween 80 se sugiere la realización de más número de experimentos.

Sin embargo, apoyados en la literatura, en donde se menciona que el Tween 80 sí presenta citotoxicidad en estudios con líneas celulares a



concentraciones molares muy bajas ($<1 \mu\text{M}$) y dado que los compuestos tampoco fueron solubles, ya no se continuó con los experimentos [74].

Tabla 13. Valores de CI_{50} de Tween 80 en algunas líneas celulares empleadas a 72 h de tratamiento.

Línea celular	CI_{50} (μM)
HeLa	1.6 ± 0.8
SW-620	0.6 ± 1.5
MDA-MB-231	1.0 ± 1.1

*Los valores indican concentraciones micromolares de $n=2$.

De lo anterior se sabe que la solubilidad juega un papel crucial en el éxito de una molécula candidata a medicamento. Una baja de solubilidad suele ocasionar problemas no solamente en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, sino también en el desarrollo de la formulación, lo que conlleva a deficiencias en el efecto biológico [78].

El problema en la búsqueda de nuevos compuestos químicos es tal que el casi 40 % se ven abandonados por las malas propiedades a consecuencia de la escasa solubilidad en agua o mala permeabilidad intestinal. Los fármacos y las moléculas candidatas como nuevos medicamentos se clasifican en cuatro grupos con base en su solubilidad y permeabilidad por el Sistema de Clasificación de Biofármacos (BCS).

El BCS fue elaborado por Gordon Amidon en 1995 (Tabla 14). Este sistema es empleado no solamente para la clasificación de medicamentos, sino también para candidatos a fármacos aprobado por la FDA.



Se ha documentado que el 75 % de las moléculas candidatas al desarrollo de fármacos tienen una baja solubilidad y pertenecen a las clases II y IV del BCS. Por lo tanto, hay un aumento significativo en las nuevas entidades químicas insolubles en comparación con los medicamentos comercializados en la actualidad; esto refleja la escala actual del problema.

Estos fármacos poco solubles en agua tienen una absorción lenta lo que conduce a una biodisponibilidad inadecuada, variable y toxicidad de la mucosa gastrointestinal [79, 80].

Tabla 14 . Sistema de Clasificación de Biofármacos [81].

CLASE	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Debido a que solo los compuestos en solución se encuentran en un estado que puede absorberse mejor desde el tracto gastrointestinal; y al ser los productos orales la forma farmacéutica preferente por las empresas, los costos de fabricación se ven en aumento al buscar mejorar la solubilidad en medio acuoso [81-83].



8.9 Citotoxicidad del inhibidor de AKT: GSK690693

Con los resultados anteriores, en donde algunos de los compuestos de las series inducen una baja en la viabilidad celular en más de una línea celular empleada. Se expuso las líneas celulares a un inhibidor de AKT, con el fin de comparar el efecto citotóxico de los derivados de piridina evaluados.

El compuesto GSK690693 es un derivado de aminofurazan e inhibidor conocido de AKT de tipo competitivo de ATP. En estudios preclínicos resultó ser un inhibidor potente y selectivo inhibiendo la proliferación celular de diversas neoplasias entre ellas; hematológicas, de mama, ovario y páncreas.

Algunos autores mencionan la disminución de la viabilidad celular y entre su mecanismo de muerte celular la inducción de apoptosis celular. Cabe mencionar que disminuye el número de sustratos fosforilados de la vía PI3K/AKT/mTOR. Es por ello que se decidió emplear como referencia para comparar su efecto citotóxico con los derivados de piridinas previamente evaluados [43, 50, 52, 66, 67, 84-86].

En la Figura 25 se puede observar que las líneas celulares responden de manera considerable al inhibidor de AKT. La línea celular SW-620 es menos sensible al efecto citotóxico al presentar la menor inhibición a la concentración máxima de aproximadamente 15 μM . Los resultados sugieren que las líneas celulares empleadas si expresan alguna de las isoformas de AKT.

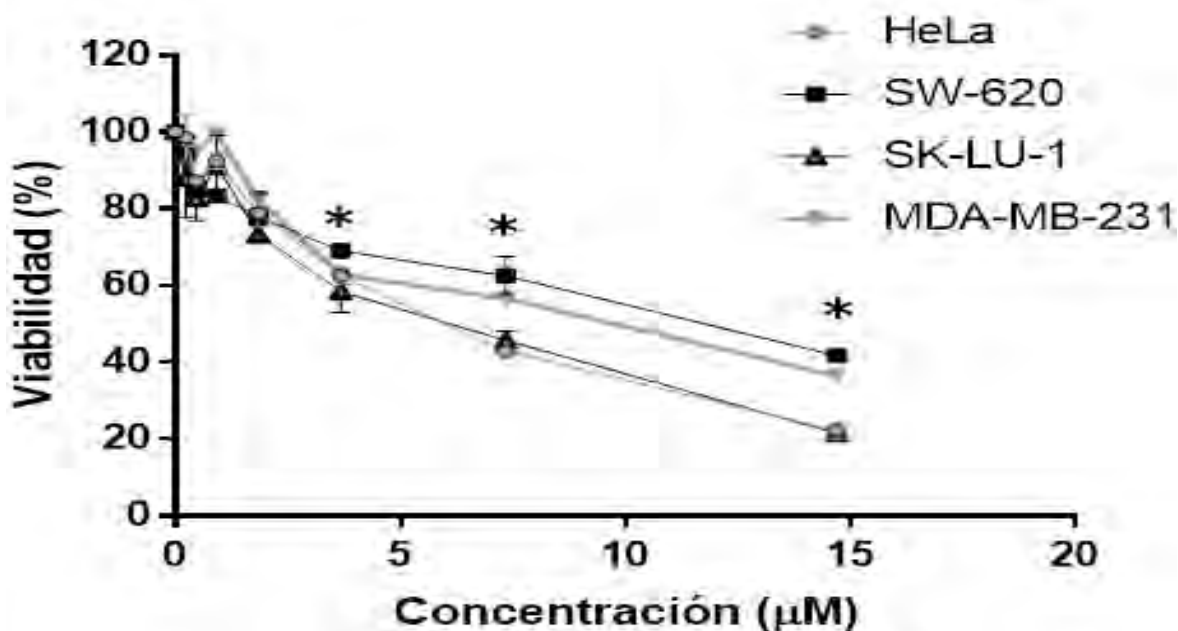


Figura 25. Viabilidad de las líneas celulares empleadas expuestas al inhibidor de AKT **GSK690693** a 72 h de tratamiento.

De la evaluación anterior fue posible realizar el cálculo preliminar de CI_{50} para las 4 líneas celulares de estudio (Tabla 15).

Tabla 15. Valores preliminares de CI_{50} del inhibidor de AKT **GSK690693** en las diferentes líneas celulares empleadas a 72 h de tratamiento.

Línea celular	CI_{50} (µM)
HeLa	5.7 ± 0.1
SK-LU-1	5.3 ± 0.8
SW-620	8.8 ± 0.1
MDA-MB-231	6.5 ± 1.2

Los valores indican al menos dos repeticiones $n \pm EEM$.



Al realizar la comparación de los resultados de la Tabla 15 con algunos de los valores de CI_{50} de las series de piridinas, el compuesto **GSK690693** es un inhibidor con una alta actividad citotóxica con valores de CI_{50} muy bajos del rango de 5.3-6.5 μM .

El valor más bajo de CI_{50} para los compuestos de la **Serie 1** fue a las 72 h de tratamiento y en la línea celular PC-3 cuyo valor para **S1-3** fue de 6.2 μM mientras que para **S1-9** de 11.61 μM .

Al comparar las CI_{50} de **GSK690693** con los obtenidos de resultados preliminares de la **Serie 3**, el compuesto **S3-11** es más citotóxico con un valor de CI_{50} de 2.1 μM en la línea celular PC-3. Dicha citotoxicidad es mayor comparada con los dos compuestos de la **Serie 1** y **GSK690693** que tuvieron actividad citotóxica. Sin embargo, para confirmar dicha actividad se debe aumentar el número de experimentos para la **Serie 3**.

Por otra parte, con lo que respecta a la actividad del fármaco candidato a medicamento, la determinación de la CI_{50} es esencial para comprender las características farmacológicas y biológicas de un agente quimioterapéutico. Sin embargo, la cuantificación de medidas que indican el grado de citotoxicidad, DL_{50} o CI_{50} , no deben considerarse como una constante biológica a tal grado que, en un mismo laboratorio, con mismas condiciones y mismo analista, los resultados pueden variar [87, 88].

Se debe de tener en cuenta que en el trabajo con líneas celulares dichos valores pueden verse modificados por diversos factores del método como pueden ser: indicador rojo fenol del medio de cultivo, cantidad de células, condiciones de incubación, precipitación de proteínas y actividad metabólica, entre otros.



Cabe mencionar que las líneas celulares son resultados de anomalías en células sanas, por lo que entre pase y pase las características pueden verse modificadas, esto aunado al estrés. Por lo que es recomendable regresar a las células congeladas durante los primeros pases [89-91].

Entre las consideraciones en el ensayo de actividad citotóxica con líneas celulares se encuentra la característica del fármaco a evaluar, principalmente la solubilidad y estabilidad. Los compuestos de baja solubilidad pueden precipitar, reduciendo así la concentración del mismo y produciendo una menor respuesta biológica.

Otra consideración al momento de realizar ensayos de actividad citotóxica es la inestabilidad química de los compuestos en las condiciones del ensayo. Algunos compuestos pueden parecer menos activos de lo que son en realidad bajo las condiciones de la evaluación [91].

Finalmente, en cuanto al método de ensayo de MTT, en el cual se evalúa la actividad metabólica de las células, se debe tener en cuenta que dicha actividad puede interferir con las lecturas del análisis. Es decir, si se tiene un mismo número de células entre pozo y pozo, pero una diferencia en la actividad metabólica de las células, la lectura por ende será diferente. Por lo que a menor actividad metabólica menor será la formación de formazan ocasionando un valor de absorbancia menor y viceversa [55].

Por lo tanto, es imprescindible para los químicos el desarrollo de agentes anticancerígenos con buena solubilidad en agua y efecto citotóxico favorable y con mayor selectividad para disminuir los efectos secundarios.



9. CONCLUSIONES

- Los compuestos **S1-3** y **S1-9** de la **Serie 1** de piridinas presentaron actividad citotóxica significativa en las líneas celulares HeLa, SW-620 y PC-3.
- Los compuestos de la **Serie 2** no presentó actividad citotóxica en ninguna de las líneas celulares.
- Los compuestos de la **Serie 3** fueron los más solubles en DMSO. Los compuestos **S3-1**, **S3-3**, **S3-5**, **S3-8**, **S3-11** y **S3-15** presentaron actividad citotóxica significativa.
- Los compuestos **S3-3** y **S3-11** presentaron los valores de CI_{50} más bajos en comparación con los obtenidos por los compuestos de la **Serie 1**.
- La línea celular PC-3 resultó ser la más sensible a la actividad citotóxica de los compuestos de las tres series de piridinas, siendo la **Serie 3** a la que mayor sensibilidad presentó.



10. PERSPECTIVAS

Los resultados presentados hasta el momento, incluidos los preliminares, confirmar la capacidad citotóxica de algunos compuestos de las diferentes series de piridinas; no obstante, se desconoce el mecanismo de muerte celular. Por lo tanto, se plantean las siguientes perspectivas para evaluaciones futuras:

- Aumentar el número de experimentos de las evaluaciones en las cuales se obtuvieron resultados preliminares para tener una mayor certeza del efecto observado anteriormente.
- Realizar ensayos de actividad inhibitoria *in vitro* en líneas celulares sanas para evaluar su seguridad como compuestos anticancerígenos.
- Determinar la actividad sobre AKT de los compuestos de la **Serie 1** cuya actividad citotóxica es prometedora y el mecanismo de muerte celular que desencadena la disminución de la viabilidad celular por los mismos.



11. REFERENCIAS

1. National Cancer Institute. About cancer. What is cancer? [consultado: 2016 noviembre]; Disponible: <http://www.cancer.gov/>
2. La importancia del diagnóstico del cáncer. Centro de investigación del cáncer y Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT). [consultado: 2017 diciembre]; Disponible: http://www.cicancer.org/uploads/archivos/memoria_importancia_diagnostico_cancer_dic2007.pdf.
3. Leber, M.F. and T. Efferth, *Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review)*. Int J Oncol, 2009. **34**(4): p. 881-95.
4. Weston A, H.C., *Multistage carcinogenesis*. Editor Can Med. EU. 2003
5. *International Agency for research on cancer. WHO*. [Consultado: 2017 Noviembre]; Available from: <http://gco.iarc.fr>
6. American Cancer Society. [consultado: 2018 enero]; Disponible: <http://www.cancer.org/>
7. INEGI. Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía. [Consultado: 2017 noviembre]; Disponible: <http://www.inegi.org.mx>.
8. National Cancer Institute. SEER training modules. [consultado: 2018 enero]; Disponible: <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>
9. Jones, R.G. and C.B. Thompson, *Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth*. Genes Dev, 2009. **23**(5): p. 537-48.
10. Ortiz-Arrazola, G.L., et al., *Identificación de factores de riesgo para cáncer de próstata*. Enfermería universitaria, 2013. **10**: p. 3-7.
11. Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco. ENCODAT 2016-2017. Genes Dev [consultado: 2018 Julio]; Disponible: www.gob.mx/salud%7Cconadic/acciones-y-programas/encuesta-nacional-de-consumo-de-drogas-alcohol-y-tabaco-encodat-2016-2017-136758.
12. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Molecular Biology of the Cell.*, 4th., Garland Science: New York. 2002.
13. Prado Romero, D.L., *Diseño de piridinas 2, 4, 6-trisustituidas como anticancerígenos inhibidores de la AKT cinasa y estudio sobre su síntesis*. 2018. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 136.
14. Parsa, N., *Environmental factors inducing human cancers*. Iran J Public Health, 2012. **41**(11): p. 1-9.
15. Anand, P., et al., *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes*. Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2097-116.



16. Wogan, G.N., et al., *Environmental and chemical carcinogenesis*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(6): p. 473-86.
17. Torre Lindsey, S.R., et al. *Global Cancer. Facts and Figures*. . 2015. **3**, 15.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
19. Sue, M.K.a.H., *Pathophysiology. The biologic basis for disease in adults and children*, ed. 7th. 2015: Elsevier Health Sciences. p. 363-400.
20. World Health Organization. 2017 [consultado 2016]; Disponible: <http://www.who.int/cancer/en/>.
21. Berenice, C.M., *El papel de YY1 en la regulación transcripcional de XAF1*. 2018. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 1-5.
22. Stowers, S.J., et al., *The role of oncogenes in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1987. **75**: p. 81-6.
23. Ronen, A. and B.W. Glickman, *Human DNA repair genes*. Environ Mol Mutagen, 2001. **37**(3): p. 241-83.
24. Wood, R.D., et al., *Human DNA repair genes*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1284-9.
25. Nowak, R.O.M., Nowacka N., *Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents*, in *Polyphenol is Human Health and Disease*. 2014, Academic Press: Lublin, Poland.
26. Varela A, S.S., *Técnicas celulares y moleculares*. 2012, Medellín: Instituto Tecnológico Metropolitano.
27. Kumar, S. and V.M. Weaver, *Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**(1-2): p. 113-27.
28. Sánchez Luis, H.V., López Rebeca., *Papel de las cadherinas en la metástasis*. Revista de Educación Bioquímica, 2005. **3, 4**(24): p. 97-103.
29. *American Cancer Society*. [consultado: 2018 enero]; Disponible: <http://www.cancer.org/>.
30. IMSS. Cuadros Básicos y Farmacovigilancia. . [Consultado 2018 Enero]; Disponible: <http://www.imss.gob.mx/profesionales-salud/cuadros-basicos/medicamentos>.
31. About cancer. Cancer research UK. [consultado 2017 Diciembre]; Disponible: <http://www.cancerresearchuk.org>
32. Urruticoechea, A., et al., *Recent advances in cancer therapy: an overview*. Curr Pharm Des, 2010. **16**(1): p. 3-10.
33. Trimmer, E.E. and J.M. Essigmann, *Cisplatin*. Essays Biochem, 1999. **34**: p. 191-211.
34. Dasari, S. and P.B. Tchounwou, *Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action*. Eur J Pharmacol, 2014. **740**: p. 364-78.



35. Kojima T, M.Y., *Cisplatin: Pharmacology, Clinical Uses and adverse effects*. Nova Science Publisher Inc, 2012: p. 1-14.
36. Beverly A, T.P., *Cancer drug resistance*. 2006, New Jersey: Humana Press.
37. National Cancer Institute. NCI Dictionary of cancer terms. [consultado 2018 Febrero]; Disponible: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/signaling-pathway>.
38. Porta, C., C. Paglino, and A. Mosca, *Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 64.
39. Armas, L.E.A.E., *Estudio de inhibidores de la ruta PI3K/AKT/mTOR en líneas celulares de carcinoma de mama con sobre-expresión de HER2, resistentes a Trastuzumab*. 2014, Universidad Politécnica de Valencia: Valencia, España. p. 81.
40. Pinzon MD, S.P., Sanabria C. , *Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/akt) en humanos*. Rev Cienc Salud, 2009. **7**(2): p. 47-48.
41. José, O.M., *Proteínas quinasas como dianas farmacológicas*. Real Academia Nacional de Farmacia, 2009. **11**: p. 15-45.
42. Yamaji, M., et al., *Novel ATP-competitive Akt inhibitor afuresertib suppresses the proliferation of malignant pleural mesothelioma cells*. Cancer Med, 2017. **6**(11): p. 2646-2659.
43. Nitulescu, G.M., Margina, D., Juzenas, P., Peng, Q., Olaru, O.T., Saloustros, E. Tsatsakis, A.M, *Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review)*. Int J Oncol, 2016. **48**: p. 869-885.
44. Trejo-Soto, P.J., et al., *In search of AKT kinase inhibitors as anticancer agents: structure-based design, docking, and molecular dynamics studies of 2,4,6-trisubstituted pyridines*. J Biomol Struct Dyn, 2018. **36**(2): p. 423-442.
45. Gotink, K.J. and H.M. Verheul, *Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?* Angiogenesis, 2010. **13**(1): p. 1-14.
46. Chen, S.F. and J.Z. Chen, *Development for anticancer therapy: small-molecule inhibitors targeting protein kinase B*. Mini Rev Med Chem, 2013. **13**(9): p. 1272-94.
47. Zhou, H., et al., *AKT and JNK Signaling Pathways Increase the Metastatic Potential of Colorectal Cancer Cells by Altering Transgelin Expression*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(4): p. 1091-7.
48. Altomare, D.A. and J.R. Testa, *Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer*. Oncogene, 2005. **24**(50): p. 7455-64.
49. Meuillet, E.J., *Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain*. Curr Med Chem, 2011. **18**(18): p. 2727-42.



50. Levy, D.S., J.A. Kahana, and R. Kumar, *AKT inhibitor, GSK690693, induces growth inhibition and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cell lines*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1723-9.
51. Lien, E.C., C.A. Lyssiotis, and L.C. Cantley, *Metabolic Reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR Pathway in Cancer*. Recent Results Cancer Res, 2016. **207**: p. 39-72.
52. Heerding, D.A., et al., *Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-[[[(3S)-3-piperidinylmethyl]oxy]-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase*. J Med Chem, 2008. **51**(18): p. 5663-79.
53. Benedi J, G.d.R.M.A., *Fármacos antineoplásicos*. Elsevier Inc, 2006. **20**(2): p. 60-65.
54. Kartalou, M. and J.M. Essigmann, *Mechanisms of resistance to cisplatin*. Mutat Res, 2001. **478**(1-2): p. 23-43.
55. Boncler, M., et al., *Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2014. **69**(1): p. 9-16.
56. Ashtosh B, I.K., Vivek K, Sun Chul K, *MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug*. Bangladesh J of Pharm, 2017. **12**(2): p. 115-118.
57. Peter, H.J.a.B., *A cellular viability assay to monitor drug toxicity, in Protein misfolding and cellular stress in disease and aging: concepts and protocols, methods in molecular biology*. 2010, Springer Science: EU. p. 303-310.
58. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
59. Sieuwerts, A.M., et al., *The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival*. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1995. **33**(11): p. 813-23.
60. Ganot, N., et al., *Anticancer metal complexes: synthesis and cytotoxicity evaluation by the MTT assay*. J Vis Exp, 2013(81): p. e50767.
61. Sylvester, P.W., *Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability*. Methods Mol Biol, 2011. **716**: p. 157-68.
62. Vostalova, J., et al., *Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay*. J Photochem Photobiol B, 2018. **178**: p. 530-536.



63. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction*. Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 127-52.
64. Stockert, J.C., et al., *MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets*. Acta Histochem, 2012. **114**(8): p. 785-96.
65. Lien, E.C., et al., *Glutathione biosynthesis is a metabolic vulnerability in PI(3)K/Akt-driven breast cancer*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(5): p. 572-8.
66. Yang, D., et al., *Design, synthesis and evaluation of novel indole derivatives as AKT inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2014. **22**(1): p. 366-73.
67. Kumar, R., et al., *Causal reasoning identifies mechanisms of sensitivity for a novel AKT kinase inhibitor, GSK690693*. BMC Genomics, 2010. **11**: p. 419.
68. *Genomics of drug sensitivity in cancer*. [consultado: 2018 Mayo]; Disponible: <https://www.cancerrxgene.org/translation/Drug/1005>
69. Gonzalez, A., et al., *Heptacoordinate tin(IV) compounds derived from pyridine Schiff bases: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, anti-inflammatory and antioxidant activity*. Chem Pharm Bull. Tokyo, 2009. **57**(1): p. 5-15.
70. Hafiza, W.A. and S.Y. Latifah, *Potential implications of GRP58 expression and susceptibility of cervical cancer to cisplatin and thymoquinone-based therapy*. Onco Targets Ther, 2014. **7**: p. 1375-87.
71. Pisano, C., et al., *Metabolic approach to the enhancement of antitumor effect of chemotherapy: a key role of acetyl-L-carnitine*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(15): p. 3944-53.
72. Felipe, J.E.y.R.L., *Importancia de la computación en la ciencia y en nuestra vida diaria*. E.C. Nacional. 2016. p. 208.
73. Jesper, L., *Methods for measurement of solubility and dissolution rate of sparingly soluble drugs*. 2009, Lunds Universite. p. 26.
74. Hamzello-Moghadam, M., Taiebi N., Mosaddegh M., Eslami Tehrani B., Esmaeili S, *The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines*. J Pharmacogn Phytochem. 2014. **1**(3): p. 41-45.
75. Nielsen, C.K., et al., *Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1878.
76. Youm, I., et al., *Influence of surface chemistry on cytotoxicity and cellular uptake of nanocapsules in breast cancer and phagocytic cells*. AAPS J, 2014. **16**(3): p. 550-67.
77. Duarte, C., et al., *Effects of biosurfactants on the viability and proliferation of human breast cancer cells*. AMB Express, 2014. **4**: p. 40.



78. Tihanyi T, V.M., *Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drugs candidates*. 2001, Bentham Science Budapest, Hungary. p. 52-59.
79. Kerns, L.D.E., *Drug-like properties: concepts, structure design and methods*, A. Press. 2015. p. 56-86, 439-452, 487-496.
80. Ketan T. Savjani, A.K.G., and Jignasa K. Savjani, *Drug solubility: importance and enhancement techniques*. ISRN Pharmaceutics, 2012. **2012**: p. 10.
81. Hacker M, M.W., Bachman K, *Pharmacology: principles and practice*. 2009. Academic Press. p.320.
82. Di Li, F.P., Mano T, *Bridging solubility between drug discovery and development*. Drug Discovery Today, 2012. **17**(9): p. 486-495.
83. Fu, X.B., et al., *Water-soluble DNA minor groove binders as potential chemotherapeutic agents: synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation, cytotoxicity and HSA interactions*. Dalton Trans, 2014. **43**(23): p. 8721-37.
84. Cen, B., et al., *Elevation of receptor tyrosine kinases by small molecule AKT inhibitors in prostate cancer is mediated by Pim-1*. Cancer Res, 2013. **73**(11): p. 3402-11.
85. Makhov, P.B., et al., *Modulation of Akt/mTOR signaling overcomes sunitinib resistance in renal and prostate cancer cells*. Mol Cancer Ther, 2012. **11**(7): p. 1510-7.
86. Romorini, L., et al., *AKT/GSK3beta signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 35660.
87. He, Y., et al., *The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(43): p. 70803-70821.
88. Lorke, D., *A new approach to practical acute toxicity testing*. Arch Toxicol, 1983. **54**(4): p. 275-87.
89. Adan, A., Y. Kiraz, and Y. Baran, *Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Curr Pharm Biotechnol, 2016. **17**(14): p. 1213-1221.
90. Gillet, J.P., S. Varma, and M.M. Gottesman, *The clinical relevance of cancer cell lines*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(7): p. 452-8.
91. van Staveren, W.C., et al., *Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells?* Biochim Biophys Acta, 2009. **1795**(2): p. 92-103.
92. Ariana, R.V., *Evaluación in vitro de derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo como inhibidores de la polimerización de la b-tubulina humana*. 2018. Universidad Nacional Autónoma de México. p. 71-74.

**ANEXO A: CONCENTRACIONES MÁXIMAS EVALUADAS****Tabla 16.** Concentraciones máximas de los compuestos de piridinas 2, 4, 6 trisustituidos evaluados con el ensayo de MTT.

Compuesto	[μ M]	Compuesto	[μ M]
Cisplatino	100.0	S3-6	102.7
S1-3	53.8	S3-7	101.6
S1-5	63.7	S3-8	101.6
S1-9	49.2	S3-9	104.1
S3-1	125.8	S3-11	81.1
S3-2	100.3	S3-16	82.8
S3-3	87.5	S3-19	115.5
S3-5	97.5	S3-20	112.4
GSK690693	14.7		



ANEXO B: FOTOGRAFÍAS DE LAS LÍNEAS CELULARES

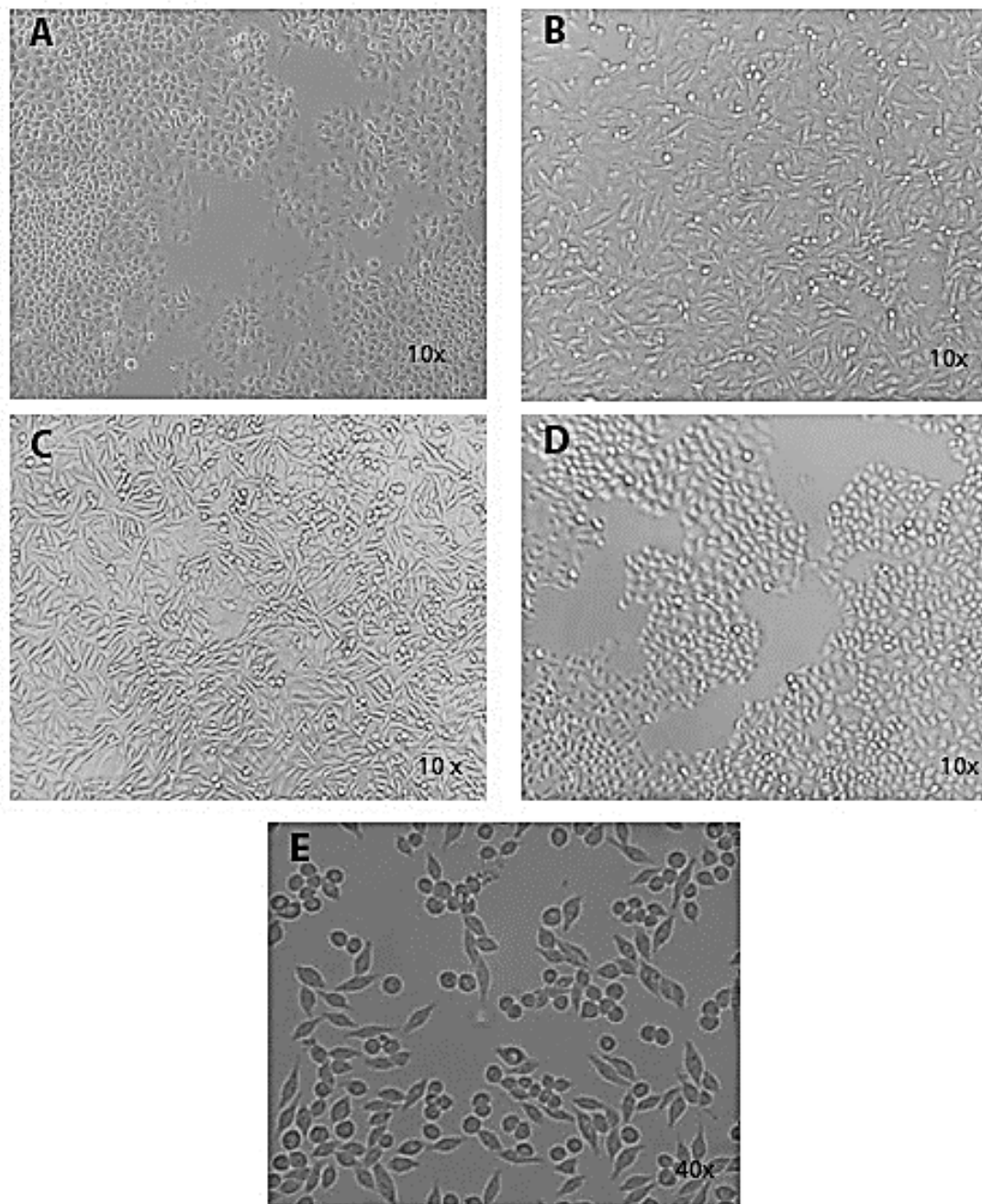


Figura 26. Líneas celulares en medio de cultivo DMEM y RPMI a 72 h de tratamiento. Únicamente para la línea PC-3 se empleó medio RPMI. **A.** Hela **B.** MDA-MB-231 **C.** PC-3 **D.** SK-LU-1 **E.** SW-620

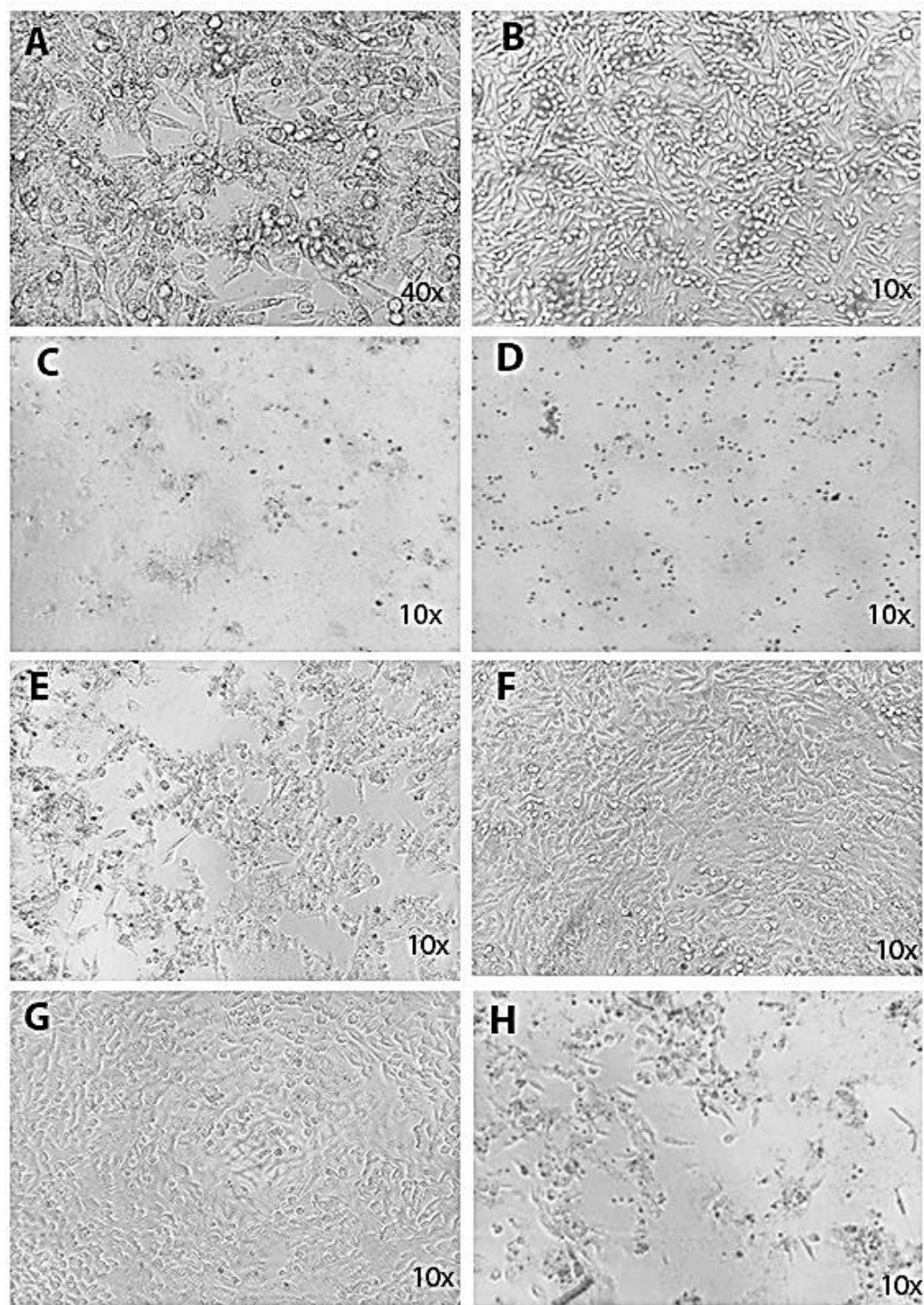


Figura 27. Líneas celulares PC-3 y SW-360 expuestas a compuestos de la **Serie 1** de piridinas a 72 h de tratamiento. A. SW-620 con **S1-2**. B. PC-3 con **S1-4**. C. PC-3 con **S1-3**. D. SW-620 con **S1-3**. E. PC-3 con **S1-5**. F. PC-3 con **S1-6**. G. PC-3 con **S1-8**. H. PC-3 con **S1-9**.

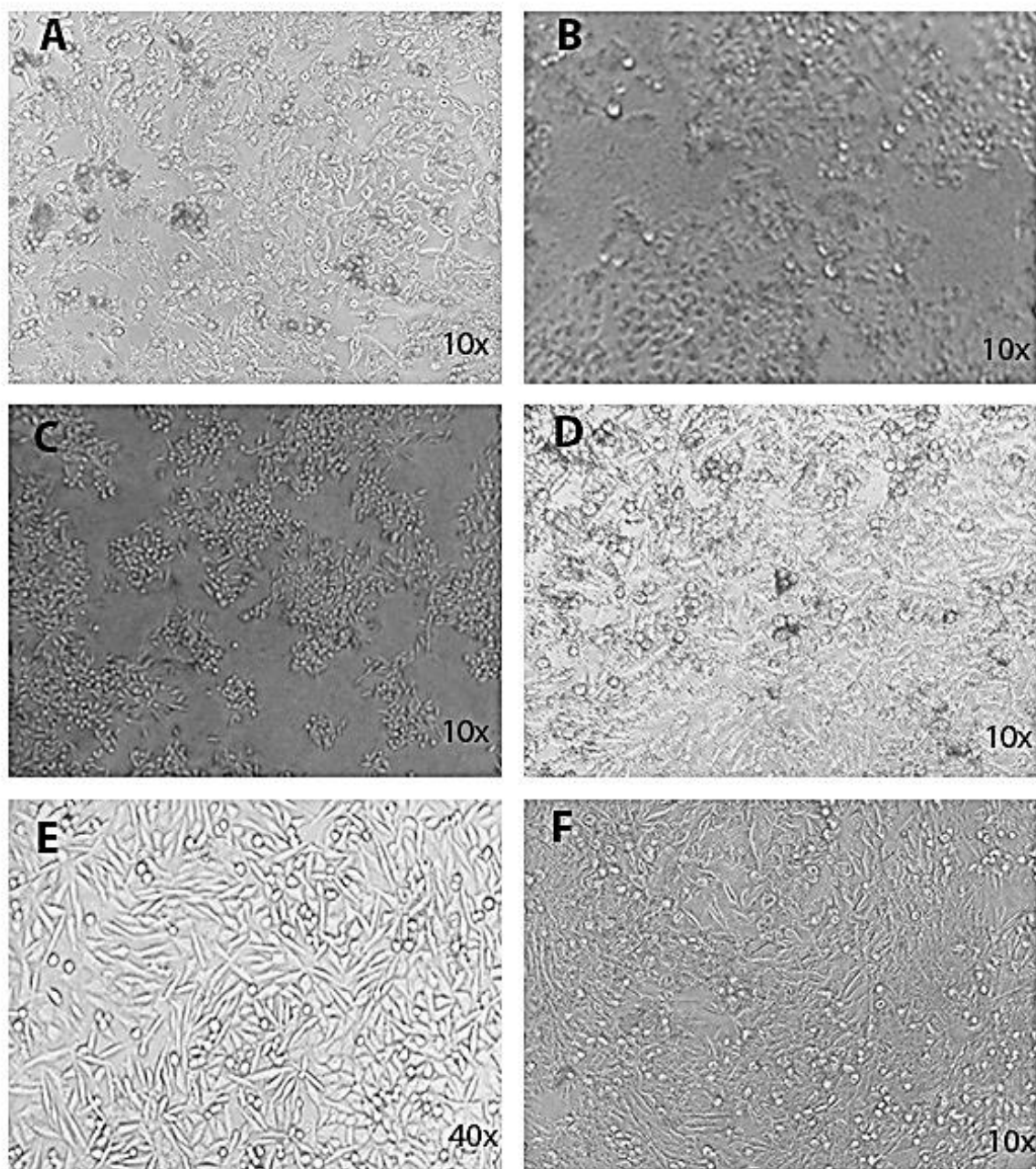


Figura 28. Línea celular PC-3 expuesta a compuestos de la **Serie 2** de piridinas a $50 \mu\text{M}$ a 72 h de tratamiento. A. **S2-1** B. **S2-6** C. **S2-8** D. **S2-9** E. **S2-11**. F. **S2-16**

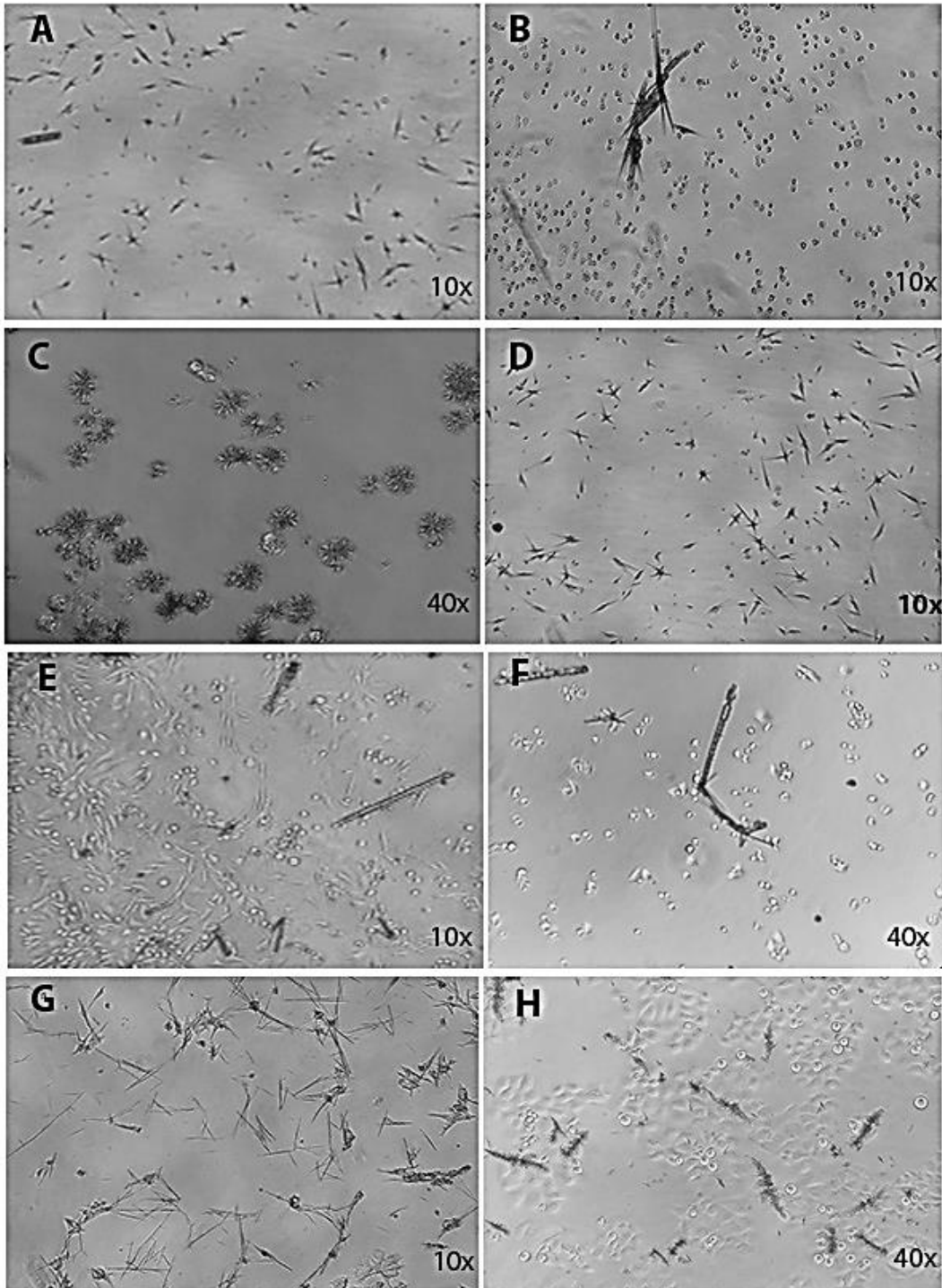


Figura 29. Líneas celulares expuestas a compuestos de la **Serie 3** de piridinas a $50 \mu\text{M}$ y su máxima concentración a 72 h de tratamiento. A. SW-620 con **S3-2**. B. SK-LU-1 con **S3-2** [$100.3 \mu\text{M}$]. C. SW-620 con **S3-3**. D. SW-620 con **S3-5**. E. SW-620 con **S3-7**. F. SW-620 con **S3-7** [$101.6 \mu\text{M}$]. G. SW-620 con **S3-8**. H. SK-LU-1 con **s3-9**.

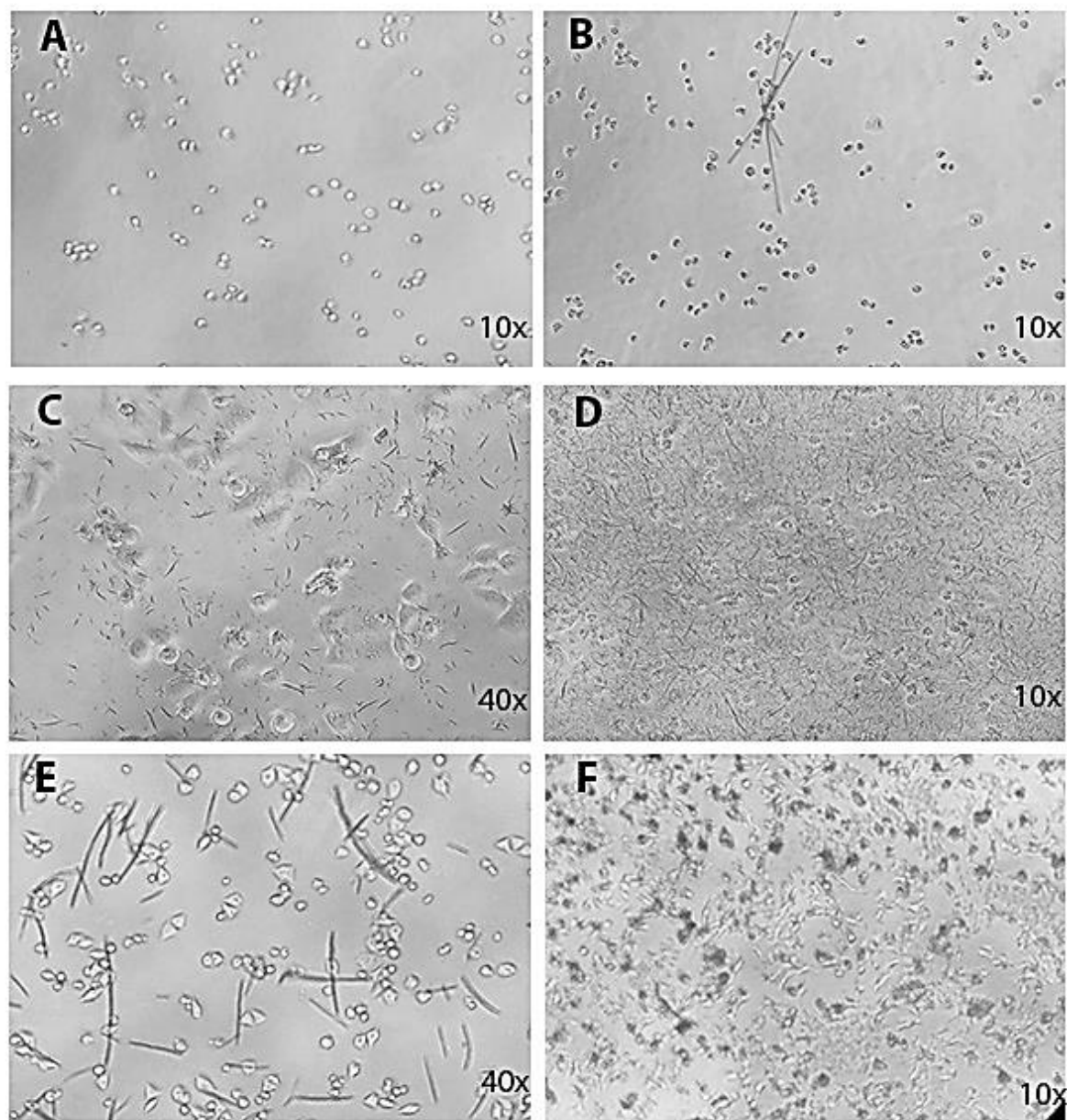


Figura 30. Líneas celulares expuestas a compuestos de la **Serie 3** a 50 μM y su máxima concentración de piridinas a 72 h de tratamiento.

A. SW-620 con **S3-11**. B. SW-620 con **S3-11** [81.1 μM]. C. HeLa con **S3-15**. D. HeLa con **S3-15**. E. SW-620 con **S3-16**. F. MDA-MB-231 con **S3-17**.

**ANEXO C: CULTIVO CELULAR****Preparación de soluciones amortiguadoras: PBS, PBS-EDTA.**

1. En 800 mL de agua desionizada se disolvió la cantidad indicada de cada compuesto indicadas a continuación. Se realizó el ajuste de pH a 7.4 de la solución resultante.

Solución PBS

Compuesto	Cantidad	Concentración
NaCl	8.0 g	136.9 mM
KH ₂ PO ₄	0.24 g	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10.14 mM
KCl	0.2 g	2.68 mM
H ₂ O desionizada	1000 mL	

Solución PBS-EDTA

Compuesto	Cantidad	Concentración
NaCl	8.0 g	136.9 mM
KH ₂ PO ₄	0.24 g	1.76 mM
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10.14 mM
KCl	0.2 g	2.68 mM
EDTA	0.372 g	1.0 mM
H ₂ O desionizada	1000 mL	



2. Posteriormente del ajuste de pH, la solución se llevó a la marca del aforo de 1L con agua desionizada.
3. A continuación, se esterilizó la solución empleado sistema de filtración equipado con una membrana de diámetro de poro de 0.22 μm .
4. Finalmente, las soluciones se almacenaron en un frasco estéril a temperatura ambiente hasta su uso.

Preparación de medio de cultivo DMEM Y RPMI 1640

1. En 700 mL de agua desionizada se disolvieron la cantidad de sales indicadas para el sistema amortiguador, con agitación constante.

Sistema amortiguador

Compuesto	Cantidad	Concentración
HEPES	2.2 g	9.23 mM
NaHCO ₃	3.7 g	44.04 mM
H ₂ O desionizada	700 mL	

2. A continuación, se añadió el contenido de un sobre de medio de cultivo en polvo (DMEM o RPMI 1640) de GIBCO-Invitrogen® al sistema amortiguador. Para evitar pérdidas y garantizar la concentración se realizó un enjuague al sobre. Mantener en agitación constante.
3. Una vez disuelto, se añadieron las siguientes soluciones comerciales de GIBCO-Invitrogen®. Lo cual se realizó en campana de flujo laminar.

**Suplementos adicionados al medio de cultivo**

Solución comercial	Volumen
Aminoácidos no esenciales (100X)	10 mL
Piruvato de sodio (100X)	10 mL
Mezcla de antibiótico-antimicótico (100X)	10 mL

4. Posteriormente, se añadió agua desionizada estéril para completar la cantidad de 900 mL. Manteniendo agitación constante.
5. Se realizó la esterilización del medio de cultivo empleando sistema de filtración equipado con membrana de poro de 0.22 μm .
6. Finalmente, se adicionó en condiciones de esterilidad, suero fetal bovino (SFB) a una concentración de 10%. Al cual se le inactivó el complemento manteniéndolo a una temperatura de 56°C durante 30 min. Para comprobar la esterilidad del medio, se tomó alícuota de 4 mL y se colocó en una caja Petri e incubó a condiciones estándar de cultivo. Hasta su uso, el medio se mantiene en refrigeración para su conservación.



ANEXO D: TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Todas las técnicas de cultivo celular a continuación se realizaron en campana de flujo laminar y con material estéril.

Descongelamiento de células

1. Las células se almacenaron en viales de congelamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un equipo ultracongelador.
2. Se descongelo rápidamente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ las células de interés.
3. Una vez que se descongelan y homogenizan, las células se centrifugan a 800 rpm durante 5 min.
4. El botón celular se resuspendió con 1 mL de medio de cultivo a temperatura ambiente transfiriéndose a una caja Petri.
5. Se añadió 2 mL más de medio de cultivo y se mantuvieron en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una atmósfera de CO_2 del 5 % y 90 % de humedad, como condiciones estándar.

Lavado y desprendimiento de células

1. Cuando las células alcanzan el 90% de confluencia celular se realizó el desprendimiento.
2. Con ayuda de micropipeta se retiró el medio de cultivo remanente de las cajas Petri, desechado en un recipiente de residuos con hipoclorito de sodio al 3-5 % aproximadamente.
3. Se realizó lavados con 2 mL de solución estéril de PBS.
4. Con ayuda de una micropipeta se retira el medio adicionado.



5. Se adicionó 2.5 mL de solución estéril de PBS-EDTA y se incubó a condiciones estándar de cultivo, durante aproximadamente 5 min o hasta observar una morfología esférica sin que floten las células.
6. Con ayuda de micropipeta, se retiró la solución anterior y se añade 2 mL de medio de cultivo estéril.
7. Se realiza el desprendimiento de las células mecánicamente con ayuda de una micropipeta, asegurándose de que no queden células adheridas.
8. Finalmente, con la alícuota resultante se realizó la propagación de células en cajas Petri, con medio de cultivo estéril, dependiendo del tipo de células se usó DMEM o RPMI.

Conteo de células en cámara de Neubauer.

En este procedimiento se determina la concentración de una suspensión celular (células/mL) a partir de la media aritmética de las células refringentes presentes en cuadrantes de 0.001 cm² de área.

1. Se realizó la limpieza del sistema de conteo conformado por la cámara de Neubauer (BAND®) y el cubre objetos con una solución de etanol al 70%.
2. Se colocó el cubre objetos sobre la cámara de Neubauer. Es importante mantener el sistema en posición horizontal sobre la mesa de trabajo.
3. Se adicionó una alícuota de 10 µL de una suspensión celular sobre el extremo de la cámara de Neubauer. La alícuota ingresó a la cámara por capilaridad hasta que formó una película homogénea. Se repite el procedimiento en caso de que se pierda volumen o haya burbujas.



4. El conteo se realizó en 4 cuadrantes de 0.1 cm de longitud de la cámara de Neubauer, de los cuadrantes externos como se observa en la Figura 31.

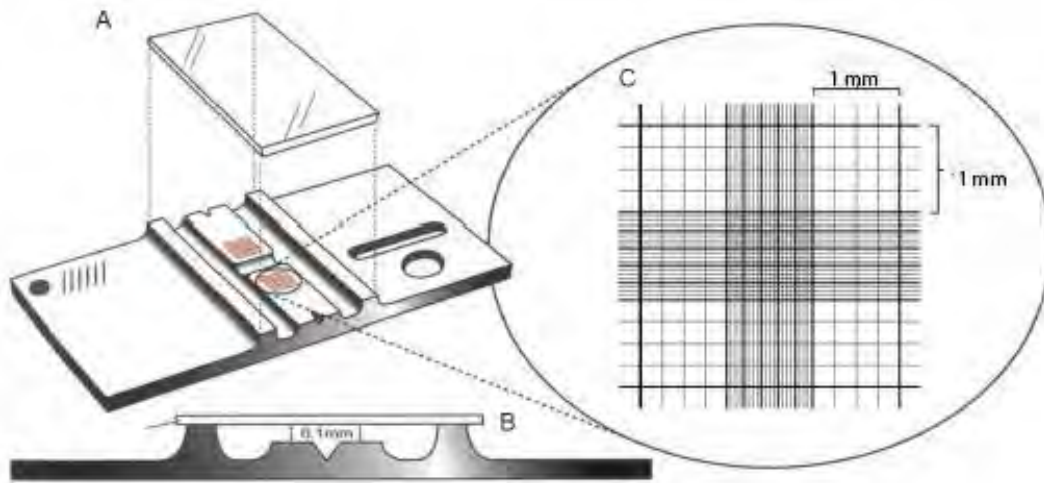


Figura 31. Representación esquemática de la cámara de Neubauer. A. Colocación del cubreobjetos. B. Vista lateral del sistema de conteo. C. Área de conteo. Tomado [92].

5. El área de un cuadrado de 0.1 cm de longitud es:
 $(0.1 \text{ cm}) * (0.1 \text{ cm}) = 0.01 \text{ cm}^2$ de superficie (s)

Por lo tanto, el volumen es el siguiente:

$$(0.01 \text{ cm}^2 \text{ de s}) * (0.01 \text{ cm de profundidad}) = 0.001 \text{ cm}^3$$
$$0.001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ mL}$$

6. El cálculo de las células en un cuadrado de 0.1 cm de longitud se realiza con la siguiente ecuación:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{Número de células contadas} * 10\,000}{\text{número de cuadrantes}}$$



Cultivo de células en placa de 96 pozos

1. Se realizó el desprendimiento de la monocapa adherente de un cultivo con buena confluencia y viabilidad celular. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente.
2. Se realizó el conteo de celular, descrito con anterioridad.
3. Posteriormente, se realizaron los cálculos necesarios para una siembra de células la cual dependía del tipo de línea celular y el tiempo de tratamiento como se observa en la Tabla 7. El volumen final en cada pozo fue 200 μ l.
4. El volumen del cálculo anterior se colocó en un depósito estéril para homogenizar constantemente durante el procedimiento.
5. A continuación, se realizó la siembra con 200 μ L con el número de células correspondientes empleando una micropipeta multicanal.
6. Por último, terminada la siembra en las placas de 96 pozos, se incubaron en condiciones estándar para que se adhieran a la placa y ser utilizada en ensayos de citotoxicidad.

Congelamiento de células

1. Se realizó el desprendimiento celular con solución de PBS-EDTA con una confluencia mínima de 80 %, como se mencionó anteriormente.
2. En tubos de centrifugación, se realiza una suspensión celular con 5 mL de medio de cultivo o solución PBS. Se realizó una centrifugación a 800 rpm por 5 min.
3. Se decantó el sobrenadante y se resuspende el botón celular obtenido con 5 mL de medio de congelamiento, el cual contenía en



5 % de DMSO como agente crioprotector en DMEM o RPMI dependiendo de la línea celular.

4. En viales de congelamiento, se transfiere 1 mL de la suspensión celular anterior, con un total de 5 viales.
5. Los viales de congelamiento, previamente bien identificados con nombre, fecha e iniciales del analista, se almacenan a -70°C en un equipo ultracongelador.