



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**Efecto Citotóxico del grupo 2,4-diaril-  
tetrahydroquinolinas sustituidas y su respuesta en  
combinación con fármacos antitumorales sobre  
células de cáncer de mama humano**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
Presentado ante la Ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por el bachiller Arturo Alejandro Muñoz Calderon  
como requisito parcial para optar al  
título de Licenciado en Biología  
Tutor: Dr. Francisco Arvelo

**Caracas, Venezuela**

**2009**



## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

*Dedico este trabajo y toda mi carrera universitaria principalmente a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo todas las barreras que se me presenten. Le agradezco a mi mami Berenice y mi padre Asís ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese cariño y calor humano necesario, son los que han velado por mi salud, mis estudios, mi alimentación entre otros, son a ellos a quien les debo todo, horas de consejos , de regaños y de alegrías, de las cuales estoy muy seguro que las han hecho con todo el amor del mundo para formarme como un ser integral y de las cuales me siento extremadamente orgulloso. Les agradezco a mis hermanas las cuales han estado a mi lado, han compartido todos esos secretos y aventuras que solo se pueden vivir entre hermanos.*

*También son parte de este trabajo las siguientes personas sin ningún orden de importancia: les agradezco a mis amigos más cercanos, a esos amigos que siempre me han acompañado y con los cuales he contado desde que los conocí. Esmeralda Montilla una amiga por siempre, una amiga que quiero como a una hermana que ha vivido conmigo todas esas aventuras durante nuestra estadía en la Universidad Central de Venezuela – “La casa que vence las sombras”; Andrea, Mary y Daniela, grandes amigas quienes me acompañaron en toda la carrera, compartiendo grandes momentos, recuerdos y brindándome todo su apoyo. Mi hermanazo Moisés, otro gran amigo que desde que lo conocí en una salida de campo inolvidable, se convirtió en mi hermano del alma.*

*Millones de gracias a ti mi bella bella, Alexandra Dos Ramos, por ser mi amiga, hermanita, parte de mi familia y mi gran amor; muchísimas gracias por el apoyo incondicional que me has brindado, gracias todo este tiempo de completa alegría y triunfos gracias por todo, TE AMO.*



## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

.....

*Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores: Felipe y Cristina por hacer de un espacio de trabajo excelente, lleno de risas y camaradería.*

*Adicionalmente, muchas gracias a todos los profesores que me han apoyado una y otra vez entre los cuales se encuentran el Dr. Francisco Arvelo, Dr. Lorena Márquez, Jorge Pérez, Alonso Ojeda, Dr. Alírica Suárez, Giovinna Orcini, Laurin, Leidi Herrera, Palmira Guevara y todos aquellos a quien no menciono por lo extensa que sería la lista.*

*Y bueno, por último pero no menos importantes gracias a mis panas ecólogos, con los que he vivido momentos extraordinarios, disgustos, etc., pero con los que he aprendido y además comparto esa gran pasión por la ecología, gracias a mis amigos Alejandro Moreno, Rubén Ramírez, Miguel Leis, César Paz, Sandra Merayo, Ricardo Martín, Kinski Sanabria, Yepsi Barreto, Luis Hernández y Lesbia Rodríguez (la tecnóloga coleada).*

*El único sitio donde el éxito llega antes que el trabajo es en el diccionario (Vidal Sassoon)*



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	VIII
INTRODUCCION.....	10
1.1. El cáncer.....	10
1.2. El cáncer a nivel mundial.....	11
1.3. El cáncer de mama.....	14
1.3.1. Antecedentes del cáncer de mama en Venezuela.....	15
1.4. Terapias contra el cáncer.....	16
1.5. Fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer de mama.....	18
1.5.1. Fármacos Antitumorales.....	18
1.5.1.1. Taxol (Paclitaxel).....	18
1.5.1.2. Gemcitabina (GEMZAR).....	20
1.6. Estudios farmacológicos aplicados en el descubrimiento de nuevos fármacos.....	21
1.6.1. Curvas Dosis-respuesta.....	23
2. ANTECEDENTES.....	25
2.1. Extractos de plantas medicinales en la terapia contra el cáncer.....	25
2.2. Quinolinas y derivados en la terapia contra el cáncer.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo general.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28



---

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1. Líneas celulares.....	29
4.2. Derivados sintéticos.....	30
4.3. Ensayo de citotoxicidad y proliferación celular.....	32
4.4. Curvas de crecimiento.....	33
4.5. Combinación (productos sintéticos + fármacos antitumorales).....	34
4.6 Nota.....	37
5. RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
5.1. Evaluación citotóxica del grupo 2,4-DAr-THQs.....	38
5.2. Índices de selectividad.....	44
5.3. Características farmacológicas y relación estructura-actividad del grupo 2,4-DAr-THQs.....	46
5.4. Efecto citotóxico del grupo 2,4-DAr-THQs sobre la tasa de crecimiento celular.....	53
5.5. Respuesta de tres moléculas pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs en combinación con fármacos antitumorales.....	55
6. CONCLUSIONES.....	69
7. BIBLIOGRAFÍA.....	71
8. ANEXOS.....	81



## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Distribución de tasas de incidencia y mortalidad en el continente americano.....	13
Fig.2. Distribución de las tasas de incidencia de cáncer de mama en Venezuela.....	16
Fig.3. Estructura química del TAXOL (Paclitaxel).....	18
Fig.4. Mecanismo de acción del Taxol.....	19
Fig.5. Estructura química de la Gemcitabina (GEMZAR).....	20
Fig.6. Características de una curva Dosis-respuesta.....	25
Fig.7. Síntesis química de las moléculas 2,4-diaril-3-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas (2,4-DAr-THQs).....	30
Fig.8. Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar en los ensayos de combinación.....	35
Fig.9. Curvas dosis - respuesta de los compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs sobre la línea MCF-7.....	50
Fig.10. Curvas dosis - respuesta de los compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs sobre la línea SKBR3.....	51
Fig.11. Curvas dosis - respuesta de los compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs sobre células control (Fibroblastos dérmicos).....	52
Fig.12. Curvas de proliferación celular de los compuestos DM5, DM8 y DM12.....	54
Fig.13. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular MCF-7.....	56



---

Fig.14. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre la línea celular MCF-7.....	57
Fig.15. Isobogramas para la línea celular MCF-7.....	58
Fig.16. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular SKBR3.....	60
Fig.17. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre la línea celular SKBR3.....	61
Fig.18. Isobogramas para la línea celular SKBR3.....	63
Fig.19. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre células control (fibroblastos dérmicos).....	66
Fig.20. Curvas dosis – respuesta para la combinación de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre células control (fibroblastos dérmicos).....	67
Fig.21. Isobogramas para las células control (fibroblastos dérmicos).....	68



## RESUMEN

El cáncer de mama según los informes de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) constituye la neoplasia maligna más común en las mujeres en el mundo occidental, y la segunda causa de muerte por cáncer en el continente americano. En el caso particular de Venezuela, el Registro Central de Cáncer – Programa de Oncología del Ministerio para el Poder Popular para la Salud (MPPS) estimó que para el año 2007, existirán en Venezuela 3.549 nuevos casos de mujeres padeciendo de cáncer de mama, con una mortalidad estimada de 1.449 mujeres. Entre los tratamientos que se aplican a los pacientes con estas patologías, la quimioterapia surge como una alternativa de gran importancia, sin embargo se ha observado que algunos tumores no responden a los fármacos (resistencia primaria o innata), mientras que otros que inicialmente son sensibles al tratamiento, eventualmente pueden desarrollar resistencia (resistencia secundaria o adquirida). Recientemente se ha mostrado interés en el uso de plantas como agentes antitumorales, ya que el cáncer es una enfermedad que comprende un conjunto complejo de signos y síntomas. El potencial terapéutico de los fármacos antitumorales derivados de las plantas pueden deberse a una variedad de mecanismos, por ejemplo: muerte por apoptosis, como molécula antiangiogénica, inhibidores de proteasas, inmunomoduladores, anti-inflamatorios. Entre los compuestos naturales de importancia están las tetrahydroquinolinas aisladas de plantas superiores. El grupo de las 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas son análogos sintéticos de las tetrahydroquinolinas (alcaloides) de origen natural aislados de diferentes plantas, como por ejemplo *Galipea officinalis* (Rutaceae). Estas estructuras tetrahydroquinolínicas son similares a otros compuestos reportados con actividades antitumorales y antioxidantes. El objetivo del presente trabajo es estudiar la actividad citotóxica del grupo de compuestos sintéticos 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas en células de cáncer de mama. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad con líneas celulares tumorales MCF-7 y SKBR3 de cáncer de mama y células normales obtenidas de cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. La técnica utilizada fue la del MTT diseñada por Mossman en 1983; luego de 72 horas de incubación se calcularon los valores de





concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ), índices de selectividad, relaciones dosis-respuesta y se realizaron combinaciones con los fármacos antitumorales Taxol y la Gemcitabina que son utilizadas recurrentemente en los tratamientos quimioterapéuticos del cáncer de mama. Los resultados obtenidos reflejan una alta selectividad de los compuestos sintéticos pertenecientes al grupo 2,4-diaril-tetrahidroquinolinas sustituidas hacia la citotoxicidad sobre las líneas celulares MCF-7 ( $CI_{50} = 3,01$  a  $30,81\mu\text{g/mL}$ ) y SKBR3 ( $CI_{50} = 6,77$  a  $56,51 \mu\text{g/mL}$ ) con respecto a las células normales ( $CI_{50} = 16,77$  a  $58,55 \mu\text{g/mL}$ ). Por otro lado, una de las 9 moléculas evaluadas en este estudio presentó un índice de selectividad casi tres veces mas grande que el obtenido para el fármaco de referencia Taxol en la línea celular MCF-7, lo que demuestra la alta selectividad de estos compuestos sintéticos hacia las células tumorales sin afectar demasiado a las células normales. La combinación del compuesto DM5 con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular SKBR3 presentó un sinergismo muy fuerte de tipo potenciación, lo que se tradujo en una disminución de la concentración de  $100 \mu\text{g/mL}$  a  $0,186 \mu\text{g/mL}$  para obtener una efectividad máxima cercana al 90% para ambos compuestos químicos. En conclusión, todos los compuestos pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs muestran una inhibición sobre la viabilidad celular sobre las líneas tumorales MCF-7 y SKBR3, conforme aumenta la dosis de los compuestos.



## 1.- INTRODUCCION

### 1.1.- El Cáncer

El cáncer se caracteriza por un crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión de genes, lo que trae como consecuencia un balance descontrolado en la proliferación y muerte celular (Ruddon, 2007). Este crecimiento descontrolado es causado por daño al ADN, lo que conlleva a mutaciones en genes, o en sus regiones reguladoras, que codifican proteínas que controlan la división celular. Se requiere la acumulación de varios eventos mutacionales para transformar una célula normal en una maligna. Estas mutaciones pueden ser causadas por agentes físicos y químicos llamados carcinógenos, por exposición a materiales radioactivos o por ciertos virus que pueden insertar su ADN en el genoma humano. Las alteraciones ocurren espontáneamente o son transmitidas en generaciones como resultados de mutaciones en líneas germinales (Lodish y col., 2004).

Desde el punto de vista clínico, el cáncer es considerado como un gran grupo de enfermedades que pueden variar según la edad de inicio, la velocidad del crecimiento, el estado de la diferenciación celular, el grado de invasión, su potencial metastático, la respuesta al tratamiento y su pronosis (Knowles y Selby, 2005).

El cáncer presenta peculiaridades dependiendo del tipo de célula donde se origina, sus causas, así como su mecanismo y grado de malignidad. Es una de las enfermedades más intensamente estudiada, habiendo pasado en los últimos años de un conocimiento muy básico a un gran avance en muchos de sus aspectos moleculares, que van desde los mecanismos por los cuales el cáncer genera metástasis hasta aquellos que explican la proliferación excesiva y la pérdida de la regulación de la apoptosis (Luque, 2000).



Por otro lado, una de las principales características que distingue a un tumor maligno de un tumor benigno es la habilidad que tenga éste de invadir localmente o migrar a sitios distantes para originar tumores secundarios. Esto ocurre por un mecanismo denominado metástasis, que se puede definir como “...*la extensión de un tumor de su sitio primario a otras partes del cuerpo, el cual ocurre por lo general por vía linfática o sanguínea...*” (Khanna y Hunter, 2005).

Las metástasis se pueden situar en diferentes órganos y en diversas regiones del mismo órgano. Además, el microambiente del órgano puede modificar la respuesta de las células del tumor metastásico a la terapia y alterar la eficacia de los agentes anticancerígenos en la destrucción de las células del tumor sin producir efectos tóxicos indeseables. Por tal motivo, uno de los obstáculos principales para tratar la metástasis es la heterogeneidad biológica de los tumores y de las metástasis primarias. (Langley y Fidler, 2007).

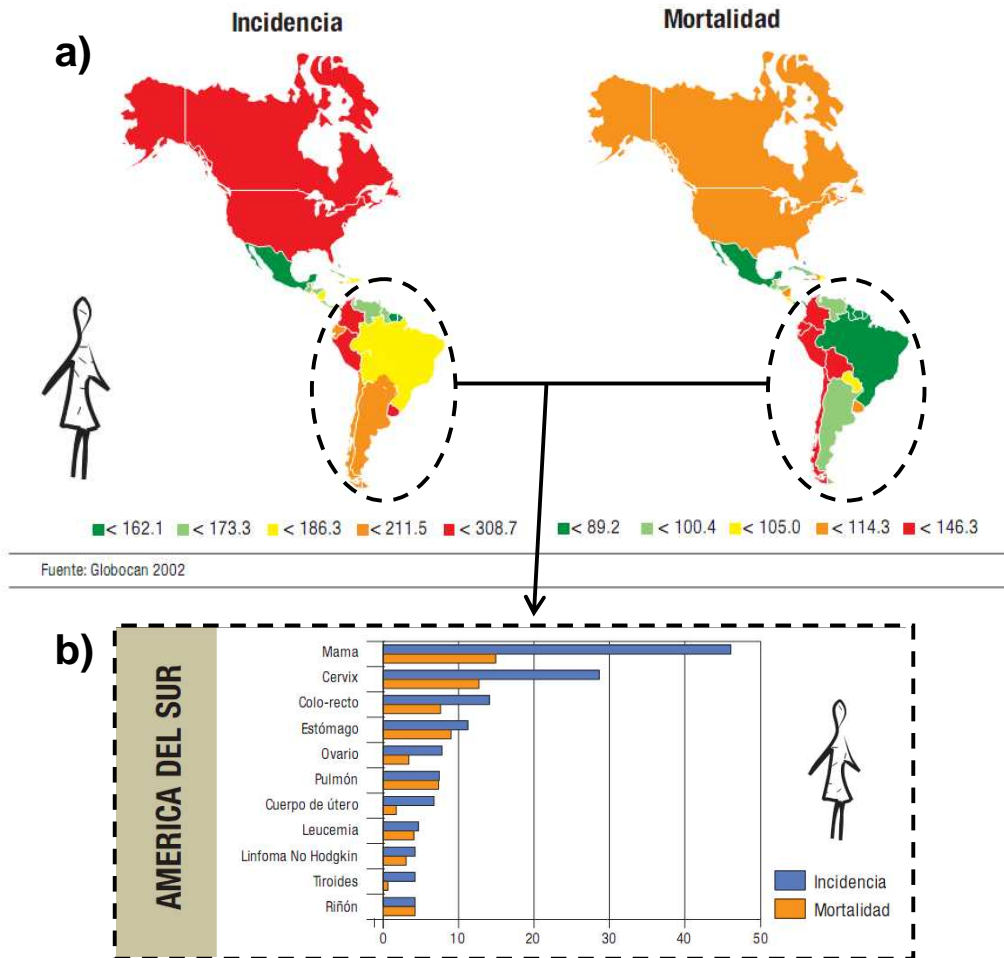
## **1.2.- El cáncer a nivel mundial**

En cuanto a la epidemiología del cáncer, el Informe Mundial del Cáncer 2008 presentado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por su sigla en inglés) alerta de la tendencia creciente de esta enfermedad que, según sus cálculos, se cobrará la vida de 17 millones de personas para el año 2030, frente a los 7,6 millones de muertes del año 2007. El estudio destaca adicionalmente que la enfermedad está creciendo con mayor velocidad en los países de ingresos medios y bajos, que tienen menos recursos para combatirla. No obstante, los países desarrollados no se libran de esta enfermedad, debido a un estilo de vida que favorece los malos hábitos, como la adicción al tabaco, seguido de la mala alimentación y la falta de ejercicio. Adicionalmente, se plantea que dada la tendencia actual, la tasa de enfermedad y muerte por cáncer se incrementará en medio punto por año, por lo que se puede concluir que el cáncer sin duda alguna es un importante problema de salud pública a nivel mundial.



Para el continente americano puede decirse en términos generales, que durante las tres últimas décadas los países de Latinoamérica y el Caribe, aunque en distinto grado, han experimentado cambios demográficos y epidemiológicos importantes. En este nuevo perfil epidemiológico, la incidencia de las enfermedades no transmisibles, y en particular del cáncer, han exhibido un aumento notorio en ambos sexos, tanto en términos relativos como absolutos, por lo que la caracterización de los patrones de incidencia y mortalidad por cáncer, y más recientemente de la supervivencia de los pacientes afectados por esta enfermedad, ha sido objeto de múltiples esfuerzos (Parkin y col., 2002; Bosetti y col., 2005). Para el año 2002, se estimaron en Latinoamérica y el Caribe más de 830.000 nuevos casos y casi medio millón de muertes por cáncer (Ferlay y col., 2002).

En el caso específico de las mujeres, las tasas de incidencia estimadas varían notoriamente en los distintos países de Latinoamérica y el Caribe (Fig. 1a). Puede apreciarse que las tasas de incidencia más elevadas corresponden a los países del hemisferio sur, pero también a un conjunto de países de la costa norte del Pacífico y del Caribe (particularmente, Cuba). Ferlay y colaboradores en el 2002, pudieron atribuirle a los tumores de mama y de cuello uterino alrededor del 40% de los nuevos casos de cáncer en estas regiones. En los países del hemisferio sur se encontraron tasas muy elevadas de cáncer de mama (Fig.1b), mientras que en el Pacífico norte y el Caribe las tasas elevadas se deben fundamentalmente al cáncer de cuello uterino, a diferencia de Cuba que tiene un comportamiento similar a los países del hemisferio Sur.



**Fig.1.- a)** Se muestra la distribución de las tasas estimadas de incidencia ajustadas por edad (población mundial estándar) y de las tasas de mortalidad, también ajustadas por edad, de todos los sitios donde potencialmente ocurren tumores (excepto el cáncer de piel diferente al melanoma) en mujeres, en el continente americano; **b)** Incidencia y mortalidad de las principales localizaciones de cáncer en mujeres, tasas ajustadas por edad (población mundial estándar) expresadas en casos por 100.000 (Tomado de Ferlay y col., 2002).



### 1.3.- El Cáncer de Mama

Como se mencionó con anterioridad, una de las principales causas de incidencia y mortalidad por cáncer en las mujeres del continente americano y en general a nivel mundial corresponde al cáncer de mama; el cual puede definirse como una proliferación neoplásica maligna originada en el compartimiento epitelial de la glándula mamaria, bien en las estructuras ductuales (aquellas que unen a los lóbulos y desembocan en el pezón) o tubulares (donde se produce la leche materna) (Pearson, 1988).

Este tipo de neoplasia presenta diversos factores de riesgo y entre los más importantes podemos encontrar:

- ❖ **La Edad:** la incidencia del cáncer se duplica por lo general luego de 10 años posteriores a la menopausia, y comparado con el cáncer de pulmón, la incidencia del cáncer de mama es más alta en edades juveniles.
- ❖ **Variación Geográfica:** en éste sentido, los estudios sobre migraciones de mujeres desde Japón hacia Hawai mostraron una alta incidencia de cáncer de mama en las segundas generaciones, indicando que los factores ambientales poseen gran importancia en los factores genéticos que determinan la patología.
- ❖ **Historia Familiar:** Casi del 10% de la incidencia de cáncer de mama en países occidentales es debido a predisposición genética. Esta susceptibilidad es generalmente concebida por una herencia dominante autosomal.
- ❖ **Estilo de vida:**
  - a) **Dieta:** Existen registros que demuestran una correlación entre la incidencia de cáncer de mama y un consumo de grasas en ciertas poblaciones.
  - b) **Peso:** La obesidad esta asociada a incrementos en los riesgos de contraer cáncer de mama en mujeres en edad postmenopáusica.
  - c) **Consumo de Alcohol:** Algunos estudios muestran un vinculo entre el consumo de alcohol y la incidencia de cáncer de mama, pero la relación es inconsistente y esto puede asociarse a otros factores dietéticos (McPherson y col., 2000).



Adicionalmente, es importante destacar que esta enfermedad no solamente la padecen las mujeres; en el caso de los hombres, el cáncer de mama es una entidad clínica poco frecuente, representa aproximadamente el 1% de todos los casos de cáncer de mama en los Estados Unidos y cerca del 0,1% de la mortalidad por cáncer en el hombre (Jemal y col., 2006; Donegan y Redlich, 1996). La incidencia de cáncer de mama en el hombre varía ampliamente alrededor del mundo, en Uganda y Zambia la tasa de incidencia anual es del 5 y 15% respectivamente, esto puede deberse a los trastornos hepáticos que condicionan un hiperestrogenismo, como ocurre en la infección por virus de hepatitis B o C, lo contrario se observa en Japón donde hay menos de 5 casos por millón de habitantes. Durante años la incidencia del cáncer de mama en el hombre había permanecido estable, sin embargo, actualmente parece haber un incremento substancial de 0,86 a 1,06 por cada 100.000 habitantes en los últimos 26 años (Giordano y col., 2004).

### **1.3.1- Antecedentes del Cáncer de Mama en Venezuela**

Para el año de 1980, el cáncer de mama representaba la tercera localización más frecuente de tumores malignos en la mujer venezolana de acuerdo al Anuario de Epidemiología del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (Ravelo, 2001), elevándose al segundo lugar trece años mas tarde, ya que para el año de 1993 se registró una incidencia de 5.000 casos por año y una tasa de incidencia de 25 por cada 100.000 mujeres (Capote, 2006).

En el año 1999 la incidencia estimada fue de 2.497 casos, con una mortalidad de 1.019 mujeres. Por otra parte, en un estudio sobre la población femenina en Venezuela, la Oficina Central de Estadística e Información (OCEI), señaló un aumento progresivo de la enfermedad en mujeres mayores de 49 años desde 1950 al año 2000, de un 65,5 a un 70 por cada 1.000 mujeres (Ravelo, 2001). Recientemente el Registro Central de Cáncer – Programa de Oncología del Ministerio para el poder popular para la Salud (MPPS) ha estimado que para el año 2007, existirán en Venezuela 3.549 nuevos casos de mujeres padeciendo de cáncer de mama, con una mortalidad estimada de 1.449 mujeres. (Capote, 2008).



En cuanto a la distribución geográfica del cáncer en el país (Fig. 2), ésta enfermedad presenta un promedio nacional para el quinquenio 2001-2005 de 24,8 casos por cada 100.000 mujeres, donde las mayores tasas de incidencia se ubican en el Distrito Federal y en los estados Miranda, Nueva Esparta, Zulia, Carabobo y Aragua, siendo estas las ciudades de mayor desarrollo económico e industrial, evidenciándose de igual forma un menor riesgo en aquellos estados de menor desarrollo y de actividades preferentemente agropecuarias (Capote, 2006).

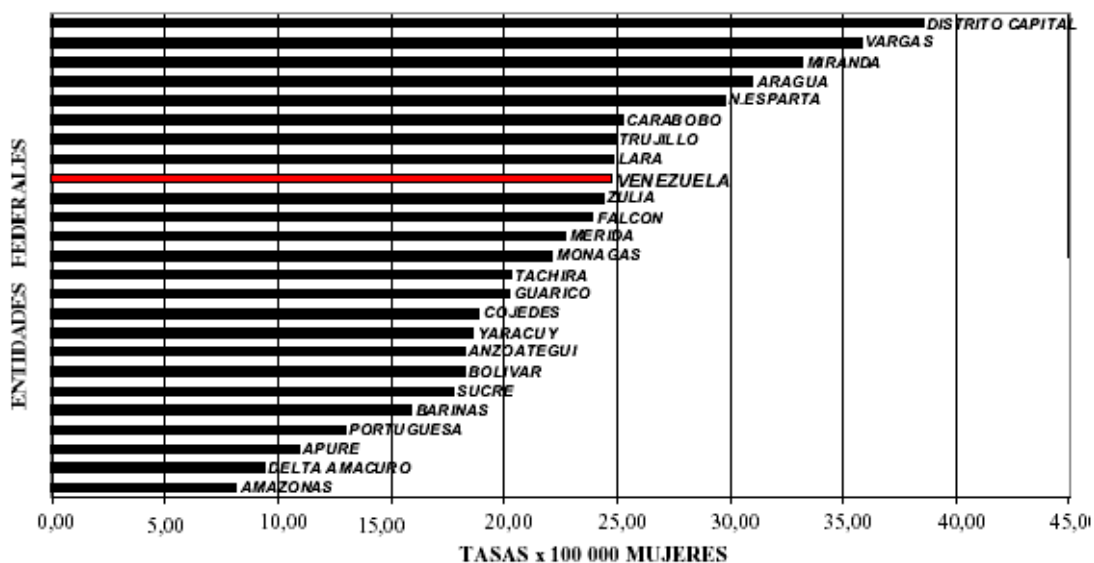


Fig. 2.- Distribución de las tasas de incidencia promedio del quinquenio 2001-2005 de cáncer de glándula mamaria por Entidades Federales. (Tomado de Ravelo, 2001)

#### 1.4.- Terapias contra el Cáncer

Al igual que se ha venido evidenciando históricamente en Venezuela, estudios recientes muestran incrementos sustantivos en las tasas de incidencia de cáncer de mama en países como Puerto Rico y Colombia (Althuis y col., 2005), con aumentos en el orden del 68% y 12% respectivamente, cuando se comparan las cifras del periodo 1973-1977 vs. 1993-1997, proponiéndose como posibles hipótesis que cambios en los hábitos nutricionales, ligados al estilo de vida, así como también el aumento del sobrepeso en las mujeres (Filozof y col., 2001), han tenido importancia en esas tendencias. En contraparte





.....

existe un declive importante de la mortalidad por cáncer de mama en Norteamérica, donde las tasas eran muy altas; esto es atribuible al progreso combinado de diagnósticos precoces y la aplicación de agentes terapéuticos efectivos.

En cuanto a este último aspecto, los tratamientos empleados para los pacientes con enfermedades neoplásicas incluyen quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y terapia hormonal, por mencionar algunas, las cuales ejercen un efecto citotóxico sobre las células malignas, mientras que la cirugía permite la resección del tumor (Alberts y col., 1994). La erradicación total de un cáncer diseminado resulta difícil, puesto que constantemente se seleccionan subpoblaciones con ventajas adaptativas que poseen la facultad de resistir al tratamiento, por lo tanto, la resistencia a los fármacos antineoplásicos limita la eficacia de estos agentes, y por consiguiente el resultado es un fracaso terapéutico.

Estas subpoblaciones celulares pueden seleccionarse por dos mecanismos distintos entre sí; se ha observado que algunos tumores no responden a los fármacos (resistencia primaria o innata), mientras que otros que inicialmente son sensibles al tratamiento, eventualmente pueden desarrollar resistencia (resistencia secundaria o adquirida) (Arvelo y col., 2000). Esto se debe principalmente, a que por lo general, cada fármaco tiene un blanco de acción específico sobre la célula tumoral (monoterapia), lo que hace que la eliminación de las células tumorales en un tumor sea limitado, sobreviviendo células que se hacen resistentes al tratamiento o que no se vean afectadas por el mismo. Por ello, hoy en día el gran aporte de la quimioterapia en la lucha contra el cáncer viene dado por la búsqueda de tratamientos que no sean generalizados para cada tipo de tumor, sino que se diseñan cócteles de fármacos (politerapia o multiterapia) a la medida de la caracterización genética de cada tumor, para que de esta manera los cócteles eliminen la mayor proporción de células cancerosas. A su vez, para que estas terapias puedan tener una alta efectividad se tienen que tener en cuenta las variaciones farmacogenéticas, según los diferentes pacientes, es decir el mismo fármaco no actúa igualmente en distintas personas con un tumor similar (Salazar, 2008), y también la farmacogenómica que se ocupa de la respuesta al tratamiento según las alteraciones moleculares del tumor (Frías y col., 2007).



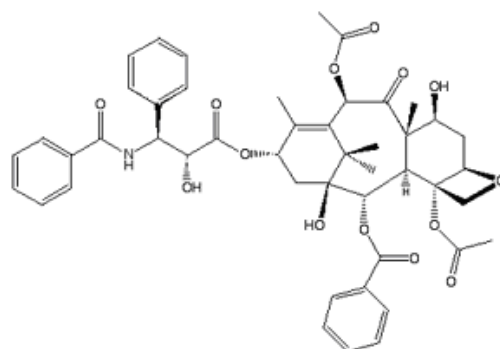
## 1.5.- Fármacos utilizados en la terapia contra el cáncer de mama

Actualmente los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer de mama involucran un sin fin de fármacos con diferentes modos de acción, entre los que tenemos: fármacos citotóxicos que destruyen la célula tumoral alterando el ADN o los microtúbulos, y los fármacos citostáticos que actúan sobre las vías de señalización intracelular, la inducción de apoptosis, la alteración de la angiogénesis o por interacción celular (Allevato, 2008). Entre los fármacos con modo de acción citotóxico de primera línea en los tratamientos quimioterapéuticos contra el cáncer de mama ya sea como agentes simples o en combinaciones se tienen al Taxol (Paclitaxel) y la Gemcitabina (Gemzar).

### 1.5.1.- Fármacos Antitumorales

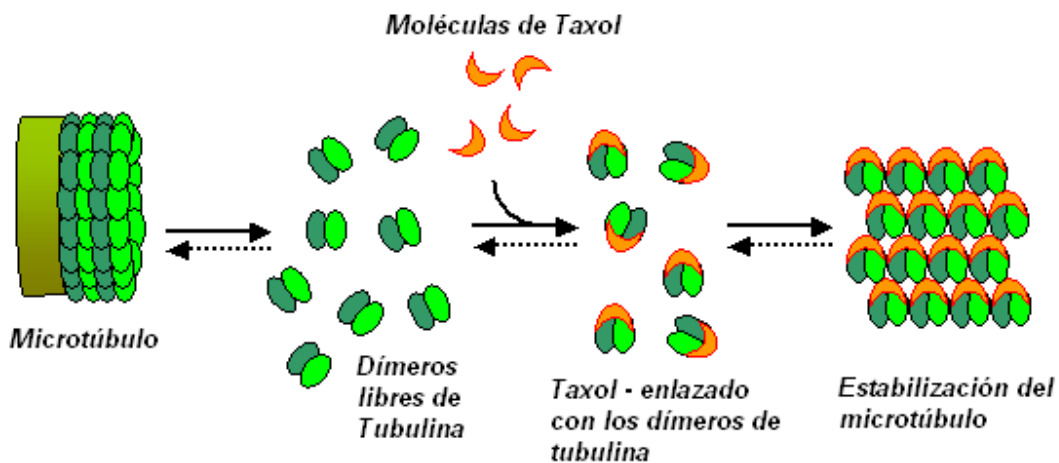
#### 1.5.1.1.- TAXOL (Paclitaxel)

El Taxol es un producto de origen natural que posee actividad antitumoral. Más específicamente es un diterpenoide, es decir, un metabolito secundario de varias especies del género *Taxus* (familia Taxaceae) (Guo y Wang, 2008), el cual se obtiene por un proceso de biosíntesis natural de fermentación. El nombre químico para el paclitaxel es 5 $\beta$ ,20-Epoxi-1,2 $\alpha$ ,4,7 $\beta$ ,10 $\beta$ , 13 $\alpha$ -hexahidroxitax-11-eno-9-ona 4,10-diacetato 2-benzoato 13.éster con (2R,3S)-N benzoil-3-fenilisoserina. Su fórmula estructural se muestra en la Fig. 4.



**Fig. 3.-** Estructura Química del TAXOL (Paclitaxel). Tomado y modificado de:  
(<http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/tax.html>)

El Taxol fue el primer taxano que mostró actividad en el cáncer de mama. La introducción del mismo en los tratamientos de cáncer de mama metastásico ha mostrado resultados satisfactorios. Este fármaco es un agente que posee un mecanismo citotóxico único de promover el ensamblaje de los microtúbulos a partir de dímeros tubulínicos y estabiliza a los mismos para prevenir su despolimeración (Fig. 4) (Lau y col., 1999), es decir, el Taxol se une a los microtúbulos (en específico a la sub-unidad de  $\beta$ -tubulina) impidiendo la despolimeración de los mismos bloqueando el proceso mitótico. Esta interrupción en la dinámica de los microtúbulos detiene irreversiblemente y posteriormente elimina a las células en las fases G2 y M del ciclo celular (Miller y Sledge, 1999).

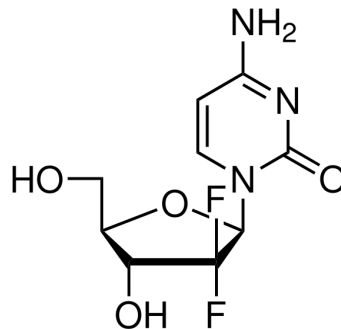


**Fig. 4.-** Mecanismo de acción del Taxol. Tomado y modificado de:  
(<http://www.staff.ncl.ac.uk/i.r.hardcastle/antibiotics.html>)



### 1.5.1.2.- Gemcitabina (GEMZAR)

La Gemcitabina es un antimetabolito que actúa como un análogo de la pirimidina, el cual es incorporado en el ADN de la célula que se encuentra en división celular causando la muerte celular (Plunkett y col., 1995a). El nombre químico para la Gemcitabina es 4-amino-1-[3,3-Difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofurano-2-il]-1H-pirimidin-2-ona. Su estructura química se muestra en la Fig. 5.



**Fig. 5.-** Estructura química de la Gemcitabina. Tomado de <http://www.cancerquest.org/images/Drugs/gemcitabine.gif>

La Gemcitabina es uno de los agentes más prometedores para el tratamiento de tumores sólidos. Este fármaco presenta una excelente actividad como agente simple y en terapias combinadas contra varios tumores resistentes, como por ejemplo el cáncer pancreático. El amplio espectro de este fármaco sobre varios tumores se debe principalmente a la presencia de múltiples mecanismos de acción (Plunkett y col., 1995b). La Gemcitabina es metabolizada intracelularmente a nucleósidos disfosfato y trifosfato, siendo su transporte (a través de la membrana celular) mediado por el transportador facilitado de nucleósidos (Heinemann y col., 1988). Posteriormente, es fosforilada a su mononucleótido por la deoxicitidina kinasa y por la nucleótido kinasa a su metabolito activo, *gemcitabina trifosfato (dFdCTP)* (Arnér y Eriksson, 1995). Este metabolito se incorpora en el ADN y es capaz de generar la inhibición de su síntesis (mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa, y por competencia con otros nucleósidos en la incorporación al ADN) (Heinemann y col., 1988; Huang y col., 1991; Ruiz van Haperen y col., 1996; Plunkett y col., 1995b).



Adicionalmente, se ha encontrado que la Gemcitabina puede incorporarse dentro del ARN (Ruiz van Haperen y col., 1993) induciendo la apoptosis (Huang y Plunkett, 1992).

Evidentemente la quimioterapia como el tratamiento más ampliamente utilizado en la lucha contra del cáncer justifica el mayor esfuerzo por encontrar nuevos compuestos que de alguna manera detengan la multiplicación de las células tumorales, y además sean selectivos, es decir, que eliminen las células tumorales causando el menor daño al tejido normal.

### **1.6.- Estudios farmacológicos aplicados en el descubrimiento de nuevos fármacos**

En concordancia con lo anteriormente expuesto, la investigación de nuevos productos naturales o sintéticos se ha convertido progresivamente en un campo interdisciplinario que comprende áreas tan diversas como la botánica, bioquímica, medicina, toxicología, nutrición, ecología, farmacología, biología celular, molecular, entre otras (Malone, 1978).

Por lo tanto, se ha hecho necesario establecer un protocolo que permita realizar un estudio exhaustivo hasta su utilización en el paciente, por lo que se requieren diferentes tipos de estudios desde el punto de vista etnobotánicos, fitoquímicos, farmacológicos y su posterior validación clínica. Según Arvelo y colaboradores (2008), la investigación de un fármaco de origen natural o sintético debe seguir los siguientes pasos:

- 1) Investigación etnobotánica
- 2) Screening farmacológico
- 3) Extracción, purificación y evaluación farmacológica.
- 4) Determinación estructural
- 5) Síntesis y modificación estructural
- 6) Mecanismo de acción
- 7) Evaluación toxicológica
- 8) Evaluación clínica



Una parte de estos estudios se realizan en animales de experimentación u otros modelos experimentales (como por ejemplo cultivos celulares), y otra en el hombre. Precisamente, la farmacología es la rama de las ciencias médicas que dispone de las técnicas y métodos para demostrar científicamente que una sustancia tiene actividad farmacológica y sí posee efectos indeseables tolerables para el hombre (Furones, 2002). Estos estudios farmacológicos presentan dos fases de estudio principalmente:

- **La farmacología Preclínica o básica**, la cual consiste en el estudio del efecto y la toxicidad en animales de experimentación u otro modelo, ya sea realizado *in vitro* o *in vivo*.
- **La farmacología clínica**, la cual comprende todos aquellos estudios realizados en los seres humanos.

Dado a que el modelo seleccionado para este trabajo consistió de cultivos celulares en condiciones *in vitro*, se hará especial énfasis en la descripción de la farmacología preclínica o básica. Esta fase de estudio se puede dividir en dos diseños experimentales, siendo el más importante y de relevancia para este trabajo el denominado como **Screening** o **Tamizaje**. Este diseño experimental consiste en la detección de una determinada acción farmacológica o cualquier actividad biológica de un compuesto nuevo, por ello se considera como una técnica **cuantitativa**. A su vez, dentro de la técnica de Screening existen dos tipos fundamentales de metodologías, denominadas Screening dirigido y a ciegas. El Screening dirigido permite hallar una determinada acción farmacológica en uno o varios compuestos. El Screening a ciegas realiza la pesquisa de múltiples actividades biológicas que pudieran



.....  
estar presentes en uno o varios compuestos para orientar hacia la acción a la que se van a dirigir los estudios posteriores. (Furones, 2002).

Por otro lado, al querer evaluar los efectos citotóxicos de nuevos compuestos naturales o sintéticos en condiciones *in vitro* o *in vivo* se debe trabajar con el segundo modelo experimental que envuelve a la farmacología básica, **los bioensayos**, dado a que los mismos constituyen una de las técnicas más empleadas en la farmacología. No son más que un procedimiento biológico que permite valorar el efecto y la potencia de un compuesto, con el objetivo de garantizar la uniformidad de los efectos que se deben obtener con su administración, por lo tanto se define como un método **cuantitativo** (Furones, 2002).

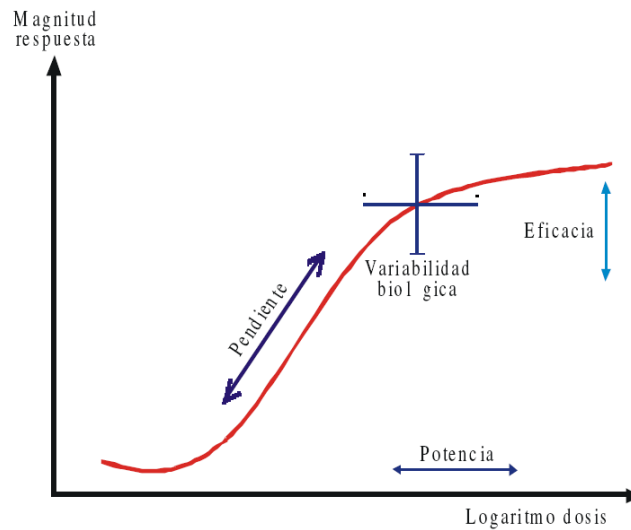
#### 1.6.1.- Curvas Dosis – respuesta

Otro de los medios comúnmente utilizados para estudiar la actividad farmacológica de algún compuesto son las curvas dosis-respuesta (curvas D-R), las cuales permiten cuantificar o estimar el efecto de una dosis dada, y nos dan la medida de la magnitud de la actividad del compuesto investigado en una dosis determinada. Generalmente las curvas D-R son de forma sigmoideal cuando el eje de las abscisas expresa el logaritmo de la dosis (concentración) y tienen cuatro variables características (Goodman y Gilman, 1996) (Fig. 6).



1. **Pendiente:** corresponde a la parte central (zona lineal) de la curva D-R y expresa la variación de los efectos del fármaco entre la dosis mínima, la umbral y la que produce el efecto máximo. De cierta forma caracteriza la unión al receptor del medicamento o compuesto evaluado.
2. **Potencia:** viene indicada por la localización de la curva D-R a nivel del eje de las abscisas, es decir, representa la actividad del fármaco por unidad de peso ( $\mu\text{g}$ , mg, gr., etc.). En este trabajo la potencia se expresa en unidades de  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , representando las concentraciones inhibitorias 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) de cada compuesto, es decir, a menor potencia farmacológica mayor actividad citotóxica en términos de  $\text{CI}_{50}$ . El caso contrario ocurre cuando se obtiene mayor potencia farmacológica.
3. **Eficacia máxima:** indica el efecto máximo que puede obtenerse mediante la administración de un determinado fármaco, definiéndose para este trabajo la eficacia máxima, como aquel porcentaje de citotoxicidad obtenido para la máxima concentración utilizada en el ensayo (por ejemplo:  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  para cada uno de los compuestos y fármacos evaluados).
4. **Variabilidad biológica:** es la aparición de diferencias en la magnitud de una respuesta farmacológica al aplicar iguales dosis de un medicamento en individuos diferentes de una población (Solo válido en estudios preclínicos *in vivo* o en estudios clínicos).





**Fig. 6.-** Principales características en una curva representativa de la relación logaritmo de la dosis vs. respuesta. Tomado y modificado de Goodman y Gilman, 1996.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1.- Extractos de Plantas Medicinales en la Terapia contra el Cáncer

A lo largo de la historia, los humanos han utilizado las plantas como agentes medicinales. Existen innumerables datos sobre el uso de plantas con fines etnomédicos en variadas formas, los cuales han sido utilizados en el desarrollo de fórmulas químicas y fármacos, contribuyendo sustancialmente al desarrollo de nuevos fármacos (Gran y col., 2000). Sin embargo hay pocos reportes acerca del uso de plantas como agentes antitumorales (Ruffa y col., 2002).



Para contrarrestar esta carencia de agentes antitumorales derivados de plantas, se están tomando en cuenta los usos etnofarmacológicos en patologías tales como inflamación, enfermedades parasitarias y virales, dado a que las mismas reflejan estadios similares a la enfermedad del cáncer y pueden ser de relevancia al momento de considerar nuevas dianas terapéuticas (Popoca y col., 1998). La naturaleza ha provisto gran cantidad de principios activos de uso corriente y efectivo contra el cáncer, algunos derivados de microorganismos como la Doxorubicina y otros de plantas como es el caso de la Vinblastina, Irinotecan, Topotecan, Vincristina, Taxanos, Etopóxidos, etc. (Ruffa y col., 2002; Cragg y Newman., 1999).

El potencial terapéutico de los fármacos antitumorales derivados de las plantas puede deberse a una variedad de mecanismos, por ejemplo: induciendo muerte por apoptosis, como molécula antiangiogénica, inhibidores de proteasas, inmunomoduladores, anti-inflamatorios (Hidalgo y Eckhart, 2001).

## **2.2.- Quinolinas y derivados en la Terapia contra el Cáncer**

En estos últimos años, se han sintetizado una gran cantidad de derivados de quinolinas en todo el mundo, cerca de 71.720 artículos de investigación que involucran sus usos biológicos pueden encontrarse en PubMed desde 1893 hasta nuestros días, obteniéndose diversos reportes en cuanto a actividades contra diversos tipos de cánceres.

Específicamente, las Tetrahydroquinolinas derivadas, conforman una importante clase de compuestos naturales o sintéticos que han mostrado un amplio rango de actividades biológicas, entre las que se incluyen antimalárica (Jacquemon-Collet y col., 2002), antitumoral (Wallace y col., 2003), antioxidante (Dorey y col., 2000) y antimicobacterial (Vangapandu y col., 2004; Monga y col., 2004). Por otra parte, diversas moléculas de quinolinas polifuncionales han sido usadas como potenciales agentes anticancerígenos (Khan, 2007), exhibiendo actividad farmacológica como agentes



.....  
anti-angiogénicos sobre células de cáncer de próstata (Isaacs y col., 2006) y como inhibidores de telomerasas en células humanas (Caprio y col., 2000)

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo es de particular interés explorar la fase de estudio preclínico por medio de un modelo de Screening dirigido, de la actividad citotóxica del grupo de las 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas, que son análogos sintéticos de las tetrahydroquinolinas; una clase de N-heterociclos presentes en la naturaleza como productos del metabolismo secundario de plantas. Adicionalmente, se evaluaron los efectos de la sustitución de diferentes grupos funcionales como nitro, nitrilo, amino e hidroxilo en zonas específicas de las moléculas de origen sintético sobre un modelo *in vitro* de cáncer de mama humano.



### 3.- OBJETIVOS

#### 3.1.- Objetivo General

En el presente trabajo se plantea como objetivo general evaluar el posible efecto citotóxico de los derivados sintéticos pertenecientes al grupo 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas sobre líneas celulares de cáncer de mama *in vitro*.

#### 3.2.- Objetivos Específicos

- Determinar el efecto citotóxico de derivados sintéticos pertenecientes al grupo 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBR3.
- Determinar el efecto citotóxico de los fármacos Gemcitabina y Paclitaxel utilizadas en la clínica para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama, en las líneas celulares MCF-7 y SKBR3.
- Evaluar el efecto citotóxico de la combinación de las 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas y los fármacos Gemcitabina y Paclitaxel en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y SKBR3.



---

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Líneas Celulares

- ✓ **MCF-7:** (Gentilmente donada por la Dr. Marie France Poupon, Instituto Curie, Paris-Francia). La línea celular MCF-7 expresa E-cadherina, receptor para el factor de crecimiento epidermal, receptor de estrógeno y receptor de progesterona. Además, carecen de la expresión de factores básicos para el crecimiento de fibroblastos, muchas de las matrices de las metaloproteasas y vimentina (University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center - Breast cancer line database, 2008). Adicionalmente, la línea celular MCF-7 expresa un tipo salvaje del gen p53 (Blagosklonny y col., 1995; Kastan y col., 1992) y presenta niveles fisiológicos de la oncoproteína HER2/neu (Vázquez y col., 2007).
  
- ✓ **SKBR3:** (Gentilmente donada Por el Dr. Manuel Rieber Instituto de Investigaciones Científicas (IVIC)). La línea celular SKBR3 no expresa E-cadherina, receptor de estrógeno y receptor de progesterona y vimentina. Por otro lado, expresa catepsina D, factor de crecimiento epidermal y la oncoproteína HER2/neu se encuentra sobreexpresada (University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center - Breast cancer line database, 2008). Al contrario de la línea celular MCF-7, las células SKBR3 llevan una delección en uno de los alelos del gen p53 y una mutación puntual en el aminoácido 175 del alelo restante, esto codifica una proteína p53 no funcional que genera un enlace defectuoso en la secuencia específica del ADN. (Blagosklonny, 1995; Kovach col., 1991).

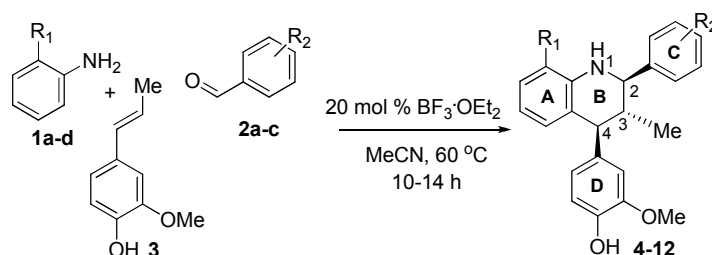
Las líneas celulares MCF-7, SKBR3 y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco), 1% de glutamina, 1% penicilina/estreptomicina.



Tanto las líneas celulares como los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos fueron mantenidos en una estufa a 37°C, y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad.

#### 4.2.- Derivados sintéticos

El grupo de compuestos químicos fueron sintetizados a partir de un compuesto fenilpropano denominado *trans*-Isoeugenol (**3**), el cual es una sustancia natural aislada por lo general de plantas de Clavos de Olor (*Eugenia caryophyllata*) y Canela (*Cinnamomum verum*), y que es caracterizada por la presencia de un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos, siendo un derivado biosintético del ácido shikímico (Martínez, 2003). Partiendo de esta estructura, se realizaron reacciones de cicloadición imino Diels-Alder (reacción de Povarov) utilizando anilinas *orto*-sustituidas (**1a-d**) y benzaldehidos (**2a-c**) para obtener un compuesto que fue denominado como 2,4-diaril-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas (2,4-Dar-THQs) (Fig. 7). Este proceso de cicloadición fue altamente selectivo, suministrando nueve isómeros que fueron sustancias sólidas y estables luego de una purificación cromatográfica (Comunicación personal del Dr. Vladímir V. Kouznetsov, Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química - Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia). Los nueve isómeros obtenidos, fueron gentilmente donados por el Dr. Vladímir V. Kouznetsov para la realización de este estudio.



**Fig. 7.-** Preparación directa de 2,4-diaril-3-metil-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas (2,4-Dar-THQs). Esquema suministrado por el Dr. Vladímir V. Kouznetsov



Para fines prácticos estos compuestos se denominaron: DM5 (4), DM1 (5), DM6 (6), DM8 (7), DM7 (8), DM12 (9), DM13 (10), DM9 (11) y DM15 (12) y sus propiedades físicas son mostradas en la Tabla 1.

**Tabla 1.-** Propiedades físicas del grupo 2,4-DAr-THQs

2,4-DAr-THQs	Grupos funcionales sustituidos		Fórmula Molecular	Punto de fusión (°C)	Peso Molecular	Log P*
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>				
(1) <i>trans</i> -Isoeugenol	/	/	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	- 10	164,2	/
DM5 (4)	H	H	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub>	173-174	345,43	4.88
DM1 (5)	NO <sub>2</sub>	H	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	204-205	390,43	5.27
DM6 (6)	CN	H	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	219-220	370,42	5.01
DM8 (7)	NH <sub>2</sub>	H	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	237-238	360	4.60
DM7 (8)	NO <sub>2</sub>	p-OH	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	138-141	406,43	4.93
DM12 (9)	NO <sub>2</sub>	o-NO <sub>2</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	191-192	435,43	5.01
DM13 (10)	NO <sub>2</sub>	p-NO <sub>2</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>	201-202	435,43	4.24
DM9 (11)	CN	p-OH	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	224-225	386,42	4.68
DM15 (12)	CN	p-NO <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	248-249	415,43	4.76

■ **Compuesto seleccionado como patrón**, dado a que las sustituciones de átomos de hidrógeno en las posiciones de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de la molécula de 2,4-DAr-THQ la hacen neutra en términos de efectos inductivos electrón-atrayente o electrón-dador.

\* Log P corresponde al coeficiente de partición, el cual mide la lipofilia de la molécula y permite definir con que facilidad atravesará las membranas biológicas. Mientras más grande este valor, mayor capacidad tendrá esa molécula de difundir por las membranas lipídicas.



#### 4.3.- Ensayo de citotoxicidad y proliferación celular

La determinación de la citotoxicidad de los compuestos disueltos en DMSO se realizó a las concentraciones siguientes: 0, 1, 5, 15, 25, 50, 80 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a través del ensayo del MTT. Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa) a un compuesto coloreado de color fucsia (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán presente (Mosmann, 1983).

- Para la determinación de la actividad citotóxica de los compuestos sintéticos se procedió de la siguiente manera:

Se utilizaron placas de 96 pozos en los cuales se sembraron 5000 células por pozo en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas para permitir la adherencia de las células, y luego de este periodo de incubación se prepararon las diluciones de los compuestos. Luego de añadir las diluciones de los productos a las células, estas se incubaron bajo condiciones de  $37^{\circ}\text{C}$  y 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 72 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se descartó el medio con los productos y seguidamente se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de MTT (0,4 mg/mL); se incubó por 3 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la formación de cristales de formazán; se eliminó el sobrenadante y finalmente se agregó 100  $\mu\text{L}$  de DMSO por pozo con la finalidad de disolver los cristales de formazán. Por último, se leyó la densidad óptica de los pozos a una longitud de onda de 570 nm ( $\text{DO}_{570}$ ) en un espectrofotómetro.

Se estableció un porcentaje de citotoxicidad (%C) para la relación entre las células control y las tratadas, con la finalidad de obtener el porcentaje de células afectadas por el tratamiento. Esto se calculó a partir de la siguiente ecuación:





$$\text{Porcentaje de Citotoxicidad (\%C)} = 1 - \frac{\text{DO}_{570} \text{ células tratadas}}{\text{DO}_{570} \text{ células control}} \times 100$$

Cada ensayo se realizó por triplicado, con sus respectivos controles: *el negativo* consistió en el solvente DMSO utilizado a una concentración de 1%, ya que, por encima de este valor se hace tóxico para los cultivos *in vitro* (Rowley y Anderson, 1993; Goldman y col., 1987), y *los positivos*, son productos con una actividad antitumoral conocida: Adriamicina, Taxol y Gemcitabina. La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), fue calculada con un intervalo de confianza del 95% mediante una regresión no lineal, usando para ello el software GRAPHPAD PRISM (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA). Además, una vez calculadas las CI<sub>50</sub> se precisó el índice de selectividad de los compuestos sintéticos, definido como la relación de citotoxicidad entre células normales y células cancerosas: CI<sub>50</sub> (Fibroblastos dérmicos)/ CI<sub>50</sub> (línea tumoral); el cual es  $\geq 1$  cuando la citotoxicidad para las células tumorales supera a la citotoxicidad en las células normales (Callacondo y col., 2008).

Los valores de comparación CI<sub>50</sub>, se realizaron sobre la base de la inhibición del 50% de la población celular en estudio (Alzamora y col., 2007)

#### 4.4.- Curvas de Crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron de la siguiente manera: las diferentes líneas celulares tumorales y cultivos primarios de fibroblastos mantenidos en cultivo fueron disociados con Tripsina-EDTA, seguidamente se centrifugaron a 2400 RPMI durante 8 a 10 minutos y luego se resuspendieron en medio de cultivo suplementado (10 % de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de glutamina). Se sembraron  $3 \times 10^3$  células en placas de 6 pozos y se incubaron con los compuestos obtenidos de la síntesis a una concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) que equivale a la concentración obtenida en la CI<sub>50</sub> para cada compuesto. Los periodos de incubación seleccionados fueron de 24, 48, 72 y 96 horas. Una vez cumplido cada periodo de 24 horas, se desprendieron las células con una solución de Tripsina-EDTA



.....

y se procedió a realizar un ensayo de viabilidad celular utilizando para ello Azul de Tripano.

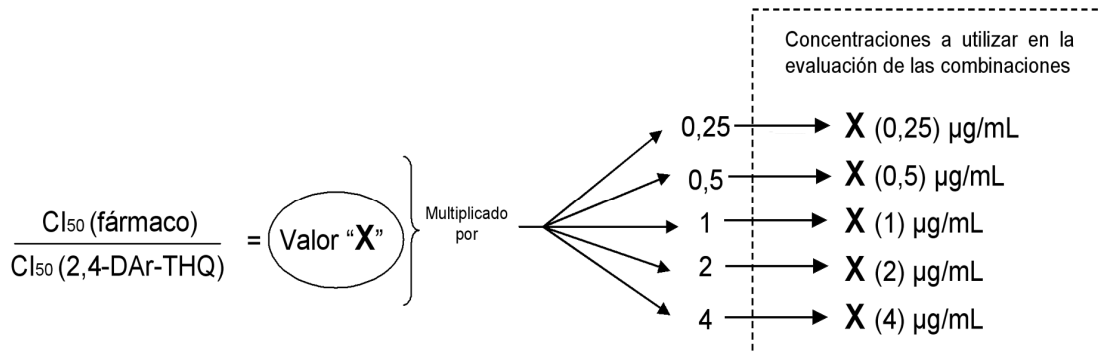
Las curvas de crecimiento se representaron mediante un gráfico XY, donde se tienen como variables la Viabilidad Celular (Células viables/mL) vs. Tiempo de incubación (Horas). Como controles negativos se utilizaron células no tratadas.

Por otra parte, se realizaron las representaciones gráficas de las curvas dosis-respuesta para los compuestos seleccionados, con la finalidad de cuantificar y evaluar ciertos parámetros de importancia farmacológica. Dicha representaciones se obtienen mediante un gráfico XY, donde se tienen como variables el % de Citotoxicidad vs. Log (Concentración de los compuestos).

#### **4.5.- Combinación (Productos sintéticos + Fármacos Antitumorales)**

Una vez determinados los valores de  $CI_{50}$  para cada uno de los compuestos químicos evaluados (Grupo 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas y fármacos antitumorales) en cada una de las líneas celulares utilizadas (MCF-7, SKRB3 y Fibroblastos dérmicos), se procedió a realizar las combinaciones de compuestos y fármacos.

El protocolo a seguir fue el propuesto por Chou y colaboradores (1984) y Chou (1991) el cual, es definido como *Método de Índice de Combinación* (M.I.C.). Este método tiene como base ecuaciones matemáticas cuyos orígenes se derivan de las usadas en los modelos de cinética enzimática. El esquema propuesto para este experimento se presenta a continuación (Fig.8) y el mismo se realizó mediante diluciones seriadas de una mezcla (compuesto sintético + fármaco antitumoral).



**Fig. 8.-** Esquema de la obtención de las concentraciones a utilizar para la evaluación de las combinaciones de los fármacos con las 2,4-DAR-THQs, basado en el diseño experimental propuesto por Chou en 1991.

Se escogió este diseño experimental ya que Chou (1991) lo recomienda para estudios preclínicos o para las etapas tempranas en el estudio de fármacos. Para este diseño, se tomó como premisa el cociente de los valores de las  $CI_{50}$  obtenidos tanto para los fármacos antitumorales como para los compuestos de origen sintéticos ( $CI_{50}$  fármaco /  $CI_{50}$  2,4-DAR-THQ), de modo que las contribuciones de los efectos citotóxicos de cada compuesto en la combinación fuesen iguales, es decir, cada combinación se realizó con una proporción 1:1. Las concentraciones a las cuales se evaluaron cada una de las combinaciones realizadas en este trabajo son mostradas en el Anexo 3.

Los ensayos de combinación se realizaron mediante la misma metodología aplicada para los ensayos de citotoxicidad y proliferación celular, y una vez que se leyeron las placas de 96 pozos en el espectrofotómetro, se procedió a calcular el índice de citotoxicidad que no es más que la misma relación del Porcentaje de Citotoxicidad sin multiplicarlo por el factor de 100.

$$\text{Índice de Citotoxicidad} = 1 - \frac{DO_{570} \text{ células tratadas}}{DO_{570} \text{ células control}}$$



Los análisis correspondientes a estos ensayos se realizaron utilizando dos softwares estadísticos. Se utilizó el software GRAPHPAD PRISM (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, USA) para el cálculo de las  $CI_{50}$  según los parámetros ya definidos con anterioridad. Además, se trabajó con el software CompuSyn (Chou y Martin, 2005), con el cual se realizaron los cálculos de los Índices de Combinación (IC) para establecer el grado de sinergismo, antagonismo o aditividad de las combinaciones. Cuando se obtienen valores de  $IC < 1$ ,  $= 1$  y  $> 1$  esto nos indica sinergismo, aditividad y antagonismo respectivamente. Por otra parte, se pudo establecer en que grado ocurrían estas interacciones, para ello, se utilizaron los rangos de IC propuestos por Chou y Martin (2005) (ver Tabla 2)

**Tabla 2.-** Rangos de IC referidos para la selección de los patrones de combinación de fármacos. Tomado y modificado de Chou y Martin, 2005)

Rango del Índice de Combinación	Descripción
$< 0,1$	Sinergismo muy fuerte
$0,1 - 0,3$	Sinergismo fuerte
$0,3 - 0,7$	Sinergismo
$0,7 - 0,9$	Sinergismo débil a moderado
$0,90 - 1,1$	Cercano a la aditividad
$1,1 - 1,45$	Antagonismo débil a moderado
$1,45 - 3,3$	Antagonismo
$> 3,3$	Antagonismo fuerte a muy fuerte

Adicionalmente, se obtuvieron representaciones gráficas de las curvas Dosis-respuesta e Isobogramas a un valor concentración inhibitoria del 50% ( $CI_{50}$ ), con los cuales se evidencian las interacciones entre los compuestos de forma individual y en combinación con cada una de las líneas celulares evaluadas y los cultivos primarios de fibroblastos.



#### 4.6.- NOTA

Para fines prácticos, los compuestos sintéticos evaluados en las curvas de crecimiento, curvas dosis-respuesta y combinaciones con los fármacos antitumorales fueron tres del grupo de tetrahidroquinolinas, siendo el criterio de selección el siguiente:

“Se tuvo siempre como referencia el compuesto patrón o DM5 (4) y a partir de la  $CI_{50}$  que se obtuvo, se seleccionó el compuesto con la mayor actividad citotóxica (menor valor de  $CI_{50}$ ) y el compuesto con la menor actividad citotóxica (mayor valor de  $CI_{50}$ ) para ambas líneas celulares”.



## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

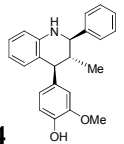
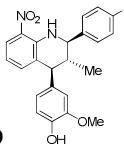
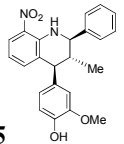
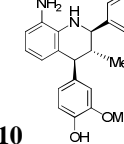
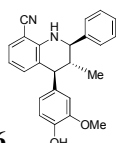
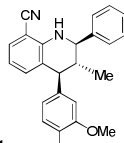
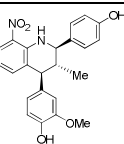
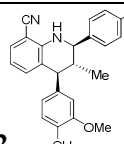
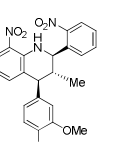
### 5.1.- EVALUACIÓN CITOTÓXICA DEL GRUPO 2,4-DAr-THQs:

En general, los efectos de los fármacos, denominándose como tal toda molécula química capaz de inducir efectos en un sistema biológico (Velasco y col., 1996), son consecuencia de su interacción con componentes macromoleculares del organismo; por tanto, la afinidad que posea un medicamento y cualquier nuevo compuesto de origen natural o sintético por su receptor y el grado de actividad intrínseca que posean, dependerá de su estructura química. En este trabajo se estudiaron los efectos de las modificaciones químicas en los esqueletos de las moléculas 2,4-DAr-THQs (**4-12**) en sus actividades citotóxicas sobre las líneas celulares tumorales MCF-7, SKBR3 y células no tumorales utilizadas como células control (cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos). La citotoxicidad *in vitro* del grupo de compuestos 2,4-DAr-THQs es mostrada en la Tabla 3 y es comparada con la citotoxicidad inducida por los fármacos antitumorales Adriamicina, Taxol y Gemcitabina utilizados como referencia.

Al analizar los resultados de la Tabla 3 se observa que todos los compuestos presentan actividad citotóxica tanto en las líneas celulares tumorales como en las células utilizadas como control; adicionalmente se puede evidenciar que esta actividad es mayor al compararla con el compuesto precursor Isoeugenol, para el que se obtuvieron valores de  $CI_{50}$  de 19,86 ; 28,1 y 29,66  $\mu\text{g/mL}$  en las líneas celulares MCF-7, SKBR3 y células control respectivamente, lo que refleja en general, un aumento en la actividad de las moléculas 2,4-DAr-THQs hasta cuatro veces con respecto a la molécula precursora. Esto lleva a inferir que las reacciones de cicloadición con las cuales se generó el grupo 2,4-DAr-THQs a partir del precursor fenilpropanoide (Isoeugenol) originaron moléculas más activas (para el caso específico de efectos citotóxicos sobre líneas celulares tumorales de mama) que su precursor aislado de fuentes naturales.



**Tabla 3.-** Valores de concentraciones inhibitorias 50% (CI<sub>50</sub>) obtenidos para cada una de las líneas tumorales de cáncer de mama utilizadas y células control. Los valores de CI<sub>50</sub> se encuentran expresados en unidades de µg/mL.

Compuesto	Líneas celulares tumorales			Compuesto	Líneas celulares tumorales		
	MCF-7	SKBR3	Fibroblastos Dérmicos *		MCF-7	SKBR3	Fibroblastos Dérmicos *
 <p><b>4</b></p>	17,52 ± 1,02	22,20 ± 1,11	16,77 ± 1,00	 <p><b>9</b></p>	4,92 ± 1,00	6,77 ± 1,01	58,55 ± 1,22
 <p><b>5</b></p>	3,01 ± 1,4	24,45 ± 1,04	17,75 ± 1,03	 <p><b>10</b></p>	14,10 ± 1,05	56,51 ± 1,58	19,33 ± 1,46
 <p><b>6</b></p>	13,13 ± 1,03	25,89 ± 1,01	23,81 ± 1,12	 <p><b>11</b></p>	24,67 ± 1,00	43,69 ± 1,01	20,47 ± 1,01
 <p><b>7</b></p>	30,81 ± 1,00	25,77 ± 1,00	19,12 ± 1,01	 <p><b>12</b></p>	13,95 ± 1,02	10,55 ± 1,02	21,19 ± 1,35
 <p><b>8</b></p>	16,73 ± 1,02	27,05 ± 1,00	26,13 ± 1,00	<p>* Los fibroblastos dérmicos (células control) se obtuvieron a partir de un cultivo primario.</p> <p>** Para los valores de CI<sub>50</sub> en unidades µM, ver Anexo 1.</p>			



Continuación Tabla 3.-

Isoeugenol	19,86 ± 0,13	28,1 ± 1,10	29,66 ± 3,75
Adriamicina	0,23 ± 0,50	0,52 ± 0,8	0,77 ± 1,37
Taxol	0,14 ± 0,08	1,03 ± 1,18	0,50 ± 1,86
Gemcitabina	0,03 ± 0,02	2,76 ± 1,54	1,29 ± 1,15

Cordell y colaboradores (1993), indican que según el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, siglas en inglés) para que un compuesto químico aislado de fuentes naturales tenga actividad citotóxica (estudios *in vitro*) o actividad antitumoral (estudios *in vivo*), y además pueda ser considerado como un potencial fármaco antitumoral, los valores de actividad deben estar definidos de la siguiente manera:

- Para extractos naturales el valor de  $CI_{50}$  debe ser  $\leq 20\mu\text{g/mL}$ .
- Para compuestos purificados, el valor de  $CI_{50}$  debe ser  $\leq 4\mu\text{g/mL}$ .

Por lo tanto, dado a que los compuestos evaluados en este trabajo presentan una molécula química de origen natural (Isoeugenol) como precursor, y dado a que en este estudio farmacológico (Screening dirigido) se busca establecer el rango de citotoxicidad de estos compuestos sintéticos sobre células de cáncer de mama humano, se tomará como valor limite para la definición de citotoxicidad una  $CI_{50} \leq 20\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, es importante resaltar que los resultados de  $CI_{50}$  en los últimos años se vienen reportando en unidades de  $\mu\text{M}$ , debido a que el peso molecular y por ende el tamaño de las moléculas por lo general son diferentes entre sí, trayendo consigo importantes características físicas que influyen en la difusión de estos compuesto a través de las membranas celulares; por lo tanto, en este trabajo se hará referencia a los valores de  $CI_{50}$  en estas unidades en determinados puntos (Para resultados en unidades de  $\mu\text{M}$ , ver Anexo 1).





De todos los compuestos evaluados, el DM12 (**9**) presentó la mayor actividad citotóxica sobre las dos líneas tumorales, presentando valores de  $CI_{50}$  en el rango de 4,92 a 6,77  $\mu\text{g/mL}$ , adicionalmente se puede evidenciar que la línea celular MCF-7 mostró (aunque en poca proporción) mayor sensibilidad a este compuesto en comparación a la línea celular SKR3. Con respecto a las células control se obtuvo una  $CI_{50}$  de 58,55  $\mu\text{g/mL}$ , evidenciando una disminución en la actividad citotóxica del compuesto **9** hasta 10 veces, con respecto a las líneas celulares tumorales. Un análisis similar puede realizarse para el compuesto DM1 (**5**) cuyos valores de  $CI_{50}$  oscilan entre 3,01 a 24,45  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando una actividad 8 veces mayor para células MCF-7 en comparación con la línea celular SKBR3.

En consecuencia, al comparar los resultados obtenidos para las moléculas **5, 6, 7, 8, 9, 10, 11** y **12** con la actividad mostrada por la molécula DM5 (**4**) seleccionada como patrón, se puede evidenciar que el aumento o disminución en la actividad citotóxica se debe en gran medida a los cambios de grupos funcionales en las posiciones 1 y 2 de los anillos A y C en la molécula base (ver Fig. 7) y sobre lo cual nos referiremos más adelante.

En cuanto a los compuestos que presentaron la menor actividad citotóxica de todo el grupo 2,4-DAr-THQs, se pueden mencionar las moléculas DM8 (**7**) y DM9 (**11**) cuyos valores de  $CI_{50}$  oscilan en el rango de 25,77 a 30,81  $\mu\text{g/mL}$  y 24,67 a 43,69  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, para los dos tipos celulares tumorales estudiados. En base a estos resultados, se puede deducir que la línea celular MCF-7 es más sensible a la citotoxicidad de los compuestos del 2,4-DAr-THQs, definiéndose siete de los nueve compuestos (**4, 5, 6, 8, 9, 10** y **12**) como citotóxicos, siendo el que presenta la mayor actividad el compuesto DM1 (**5**) con una  $CI_{50}$  de  $3,01 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$  seguido del compuesto DM12 (**9**) con una  $CI_{50}$  de  $4,92 \pm 1,00 \mu\text{g/mL}$ . Para a la línea celular SKBR3, dos de los nueve compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs se definen como citotóxicos, siendo estas las moléculas **9** y **12** con  $CI_{50}$  de  $6,77 \pm 1,01$  y  $10,55 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$  respectivamente.



Los resultados obtenidos en este trabajo para las líneas celulares tumorales MCF-7 y SKBR3 pueden compararse con varios compuestos de origen natural o sintético evaluados por otros autores, y aunque estructuralmente estos compuestos no presentan una semejanza exacta con el grupo 2,4-DAr-THQs, son una muestra representativa de los estudios realizados con moléculas de tetrahydroquinolinas en líneas celulares tumorales de cáncer de mama humano. Kemnitzer y colaboradores (2008), obtuvieron por vía de síntesis, moléculas de tetrahydroquinolinas, las cuales indujeron apoptosis en células de la línea T47D de cáncer de mama con una  $CI_{50}$  de  $5\mu\text{M}$ . Por otra parte, Wallace (2005) sintetizó un grupo de tetrahydroquinolinas, las cuales mostraron un rango de actividad citotóxica entre  $4,88\mu\text{M}$  a  $5,87\mu\text{M}$  en la línea celular MCF-7. Este mismo autor en el 2006, sintetizó otra serie de moléculas de tetrahydroquinolinas derivadas obteniendo valores de  $CI_{50}$  en el rango comprendido de  $4,7\mu\text{M}$  y  $9,89\mu\text{M}$  para la línea celular MCF-7 (Wallace, 2006). Al comparar estos valores con el resultado obtenido para la molécula más activa del grupo de las 2,4-DAr-THQs sobre la línea celular MCF-7 (molécula **5**), puede observarse un valor de  $7,71\mu\text{M}$  (ver Anexo 1), el cual se encuentra muy cercano a los valores obtenidos por los investigadores mencionados.

Con respecto a los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos, seis de las nueve moléculas (**4**, **5**, **7**, **10**, **11** y **12**) presentaron actividad citotóxica con respecto a lo propuesto por el NIC, pero es importante destacar que el compuesto **9** presentó un valor de  $CI_{50}$  de  $58,55 \pm 1,22\mu\text{M}$ , lo que se traduce en una disminución en la actividad citotóxica de aproximadamente 12 veces con respecto a la línea celular MCF-7 y de 9 veces con respecto a la línea celular SKBR3. Un resultado muy similar se obtuvo para los compuestos **4**, **5**, **6** y **8** los cuales presentaron una disminución en la actividad citotóxica importante en las células control con respecto a la actividad obtenida para la línea celular MCF-7, lo que corrobora la acción citotóxica selectiva de estas moléculas sobre las células tumorales de mama (MCF-7 o SKBR3) afectando lo menos posible a las células normales.

Estos resultados son alentadores, ya que si se comparan con moléculas de tetrahydroquinolinas que fueron aisladas de plantas de *Galipea officinalis* (Familia Rutacea) por Jacquemond-Collet y colaboradores en el 2002, éstas presentaron



valores de  $CI_{50}$  en el rango de 5,8 a 8,5  $\mu\text{g/mL}$  en un estudio realizado con líneas celulares de fibroblastos humanos. Esto quiere decir, que las moléculas del grupo 2,4-DAr-THQs obtenidas por vía de síntesis presentan menor actividad citotóxica,  $CI_{50}$  en el rango de 16,77 a 58,55  $\mu\text{g/mL}$ , sobre las células normales en comparación con moléculas aisladas de fuentes naturales.

No obstante, ninguno de los compuestos evaluados presentó mayor actividad citotóxica que los compuestos de referencia Adriamicina, Taxol y Gemcitabina. Para el caso del Taxol, estudios realizados por Merlin y colaboradores (2002) reportan valores de  $CI_{50}$  de 0,03  $\mu\text{M}$  y 0,10  $\mu\text{M}$  para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3, los cuales al compararlos con los resultados obtenidos presentan mayor actividad citotóxica (ver Anexo 1), lo que lleva a pensar que las líneas celulares tumorales utilizadas en este trabajo son menos sensibles a estos fármacos. Por otra parte, estudios realizados por Nagourney en 2001 utilizando análisis *ex vivo*, es decir, cultivos primarios de biopsias de un tumor sólido de mama, determinó valores de  $CI_{50}$  de 9,84 y 293,67  $\mu\text{M}$  para tratamientos con Taxol y Gemcitabina respectivamente. En comparación con los resultados obtenidos en las líneas celulares evaluadas, los valores reportados por Nagourney son más elevados, debido a que al trabajar con células tumorales en condición de cultivos primarios se tiene una mayor heterogeneidad en los estadios celulares y adicionalmente se pueden tener otros tipos celulares (fibroblastos por ejemplo), por lo tanto, en estos cultivos se presentarán distintos grados de sensibilidad a la acción citotóxica de los fármacos, con lo cual se pueden obtener registros más elevados de  $CI_{50}$ .

Para el compuesto de referencia Adriamicina, estudios realizados por Schuurhuis y colaboradores (1993) reportan valores de  $CI_{50}$  de 0,19 $\mu\text{M}$  para la línea celular MCF-7, valor que se encuentra al igual que en caso del Taxol y la Gemcitabina por debajo de los resultados obtenidos en este estudio ( $CI_{50} = 0,40\mu\text{M}$ ), por lo que se podría seguir afirmando que los modelos celulares utilizados en este estudio, son menos quimiosensibles a la acción de estos fármacos en comparación con las líneas celulares utilizadas por otros investigadores.



## 5.2.- ÍNDICES DE SELECTIVIDAD:

Otro de los aspectos evaluados en este trabajo fue la obtención de los índices de selectividad, los cuales ya se definieron como la relación de citotoxicidad entre células normales y células cancerosas:  $CI_{50}$  (Fibroblastos dérmicos)/  $CI_{50}$  (línea tumoral) (Callacondo y col., 2008). Los valores obtenidos son mostrados en la Tabla 4, y en los mismos se puede ver que para la línea celular MCF-7 la gran mayoría de las moléculas del grupo 2,4-DAr-THQs presentan una alta selectividad en su acción citotóxica, dado a que sus índices son mayores a 1, siendo la actividad del compuesto **9** hasta 11,9 veces más citotóxica sobre las células tumorales de la línea MCF-7 con respecto a las células normales. Para el caso de línea celular SKBR3, siete de los nueve compuestos sintéticos presenta índices por debajo de 1, lo que indica una mayor actividad citotóxica en las células normales en comparación con las células tumorales. Esto puede deberse a la característica intrínseca que poseen estas células, ya que, codifican una proteína p53 no funcional (Blagosklonny y col., 1995; Kovach y col., 1991), que al parecer, genera un efecto directo positivo sobre la proliferación celular (Cossman y Schlegel, 1991), causando que la actividad citotóxica en las células tumorales sea menor que en los cultivos primarios de fibroblastos.

Adicionalmente, si tomamos los índices de citotoxicidad de los compuestos más activos del grupo de tetrahydroquinolinas para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 y los comparamos con los índices obtenidos para los fármacos de referencia, se evidencia que tanto el compuesto **5** como el **9** presentan una actividad citotóxica más selectiva para las células tumorales, con respecto a los fármacos de referencia Adriamicina, Taxol; por lo que estos nuevos compuestos poseen un mayor margen de seguridad en cuanto a su toxicidad en células normales, aunque tienen que realizarse estudios adicionales en modelos *in vivo* y posteriormente su validación clínica.



**Tabla 4.-** Valores de índices de selectividad obtenidos para el grupo de moléculas 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas y fármacos comerciales utilizadas en clínica para pacientes con cáncer de mama.

<b>Compuesto</b>	<b>Índice de selectividad</b>	
	<b>MCF-7</b>	<b>SKBR3</b>
(4) DM5	<b>2,23</b>	<b>0,75</b>
(5) DM1	<b>5,89</b>	<b>0,72</b>
(6) DM6	<b>1,81</b>	<b>0,92</b>
(7) DM8	<b>0,62</b>	<b>0,74</b>
(8) DM7	<b>1,56</b>	<b>0,96</b>
(9) DM12	<b>11,9</b>	<b>8,64</b>
(10) DM13	<b>1,37</b>	<b>0,34</b>
(11) DM9	<b>0,82</b>	<b>0,46</b>
(12) DM15	<b>1,52</b>	<b>2,00</b>
Isoeugenol	<b>1,49</b>	<b>1,41</b>
Adriamicina	<b>3,34</b>	<b>1,48</b>
TAXOL	<b>3,57</b>	<b>0,48</b>
GEMZAR	<b>43,0</b>	<b>0,47</b>



\*\*\*\*\*

### 5.3.- CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS Y RELACIÓN ESTRUCTURA- ACTIVIDAD DEL GRUPO 2,4-DAr-THQs:

Como se mencionó con anterioridad, las diferencias de citotoxicidad entre los compuestos evaluados podría explicarse tomando en cuenta que su actividad intrínseca y la afinidad que tienen éstos por su receptor específico, tienen estrecha relación con su estructura química. Esta relación es muy rigurosa y cualquier modificación de la molécula puede afectar los efectos farmacológicos de las mismas. Para el caso específico de las moléculas pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs, se han podido establecer diferencias estructurales, a partir de las cuales se pueden hacer deducciones en cuanto al estudio de su relación estructura química-actividad biológica. Las diferencias estructurales encontradas en este grupo de moléculas vienen dadas por el grado de sustitución y el volumen de los sustituyentes en las posiciones R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> de la molécula base (ver Fig.7). Los compuestos evaluados se pueden agrupar en tres conjuntos diferentes, los cuales se describen a continuación:

- ✓ El primer grupo incluye a las moléculas **4, 5, 6 y 7** y se caracteriza por la sustitución de diversos grupos químicos en la posición 1 del anillo A de la molécula base del grupo 2,4-DAr-THQs manteniendo siempre fijo un átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo C.
- ✓ El segundo grupo contiene a las moléculas **8, 9 y 10** caracterizándose por la sustitución de diversos grupos químicos en la posición 2 del anillo C de la molécula base del grupo 2,4-DAr-THQs, manteniendo siempre fijo un grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición 1 del anillo A.
- ✓ El tercer y último grupo incluye a las moléculas **11 y 12** caracterizándose por la sustitución de diversos grupos químicos en la posición 2 del anillo C de la molécula base del grupo 2,4-DAr-THQs, manteniendo siempre fijo un grupo nitrilo o ciano (CN) en la posición 1 del anillo A.



En la primera serie de compuestos es evidente observar que la diferencia estructural se encuentra relacionada con el grupo sustituyente de la posición 1 del anillo A en el esqueleto químico (ver Tabla 1), que para el compuesto DM5 (**4**) es un átomo de hidrógeno y por tal motivo se le seleccionó como molécula de referencia a patrón. Al cambiar el átomo de hidrógeno de la posición 1 del anillo A por un grupo nitro (**5**) se observa una disminución en la potencia farmacológica (aumento en la actividad citotóxica) de ésta molécula en la línea celular MCF-7 y células control (Fig. 9a y 11a). Específicamente, para la línea celular MCF-7 el aumento de la actividad fue de casi tres veces con respecto a la molécula patrón (**4**). No obstante, la disminución en la potencia farmacológica del compuesto **5** comprometió la efectividad máxima, disminuyendo en un 6% en comparación con la efectividad máxima obtenida para el compuesto patrón (Ver %C en el Anexo 2). Por otro lado, al sustituir el átomo de hidrógeno de la posición 1 del anillo A de la molécula patrón (**4**) por un compuesto ciano (**6**) y amino (**7**) es posible observar un aumento en la potencia en ambos compuestos sobre las líneas tumorales y células control, que para el caso específico del compuesto **7** fue de casi cuatro veces en la línea celular MCF-7 y de aproximadamente dos veces para la línea celular SKBR3; aunque en términos de efectividad máxima, se mantiene aproximadamente el mismo porcentaje de actividad citotóxica con respecto al compuesto **4** (Fig. 9a y 10a).

En consecuencia, se podría inferir que la sustitución de un nitrocompuesto (R-NO<sub>2</sub>) en la posición 1 del anillo A del esqueleto de estas tetrahydroquinolinas es importante para el aumento de la actividad citotóxica sobre las células de cáncer de mama humano.

Partiendo de esta premisa, se procedió al estudio estructura-actividad del segundo grupo de compuestos, los cuales como ya se mencionó, se caracterizan por la sustitución de diversos grupos funcionales en la posición 2 del anillo C del esqueleto de la molécula, manteniendo fijo el compuesto nitro en la posición 1 del anillo A; por consiguiente, para el estudio de este grupo se tendrá como referencia la actividad del compuesto **5**. Al realizar la sustitución del átomo de hidrógeno que se encuentra en la posición 2 del anillo C del compuesto **5** por un grupo hidroxilo en posición *para* se obtiene la molécula **8**, en



la cual se ve aumentada la potencia farmacológica de forma significativa con respecto a la molécula de referencia (**5**), específicamente en la línea celular MCF-7; en cuanto a la molécula patrón (**4**) también se puede observar una disminución importante en la actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7, siendo estos cambios menos significativos en línea celular SKBR3 y células control. Al sustituir el átomo de hidrógeno de la posición 2 del anillo C en la molécula **5** por nitrocompuestos en posición *orto* (**9**) y *para* (**10**), es posible observar dos comportamientos en términos de acción citotóxica. La molécula que posee la sustitución del grupo nitro en posición *orto* en la posición 2 del anillo C (**9**) presentó una actividad citotóxica incrementada, es decir, su potencia disminuyó aproximadamente dos veces con respecto a la molécula patrón (**4**); aunque al compararla con el compuesto **5** su potencia farmacológica aumento en 3/2 (1,5 veces menos actividad) para el caso de la línea celular MCF-7. No obstante, es importante destacar que ésta estructura química es la que presenta la mayor actividad citotóxica en la línea celular SKBR3 y la menor actividad sobre las células control, lo que ratifica la alta selectividad hacia la acción citotóxica sobre las células tumorales de este esqueleto químico. Para el caso del compuesto con la sustitución del grupo nitro en posición *para* en la posición 2 del anillo C (**10**), se evidenció un aumento en la potencia farmacológica con respecto a la molécula utilizada como patrón (**4**), siendo hasta cuatro veces mayor en comparación con la molécula **5** para la línea celular MCF-7. En cuanto a la eficacia máxima, la configuración química de la molécula **9** logró incrementar el porcentaje de citotoxicidad en aproximadamente 3% en ambas líneas celulares con respecto a la molécula **4**, y para el caso específico de la línea celular MCF-7, el incremento fue de 9% con respecto a la molécula **5** (Ver Anexo 2), por lo que se puede señalar que la configuración de la molécula **9** a pesar de tener una potencia farmacológica mayor a la del compuesto **5**, es citotóxicamente más activo sobre células MCF-7.

Por último se mencionaran los efectos inducidos por los diversos sustituyentes en el tercer grupo de moléculas, para lo cual se tendrá al compuesto **6** como referencia, dado a que se mantiene la sustitución del un grupo ciano en la posición 1 del anillo A de la molécula base (Fig.7). Los sutituyentes en este caso fueron un grupo hidroxilo en



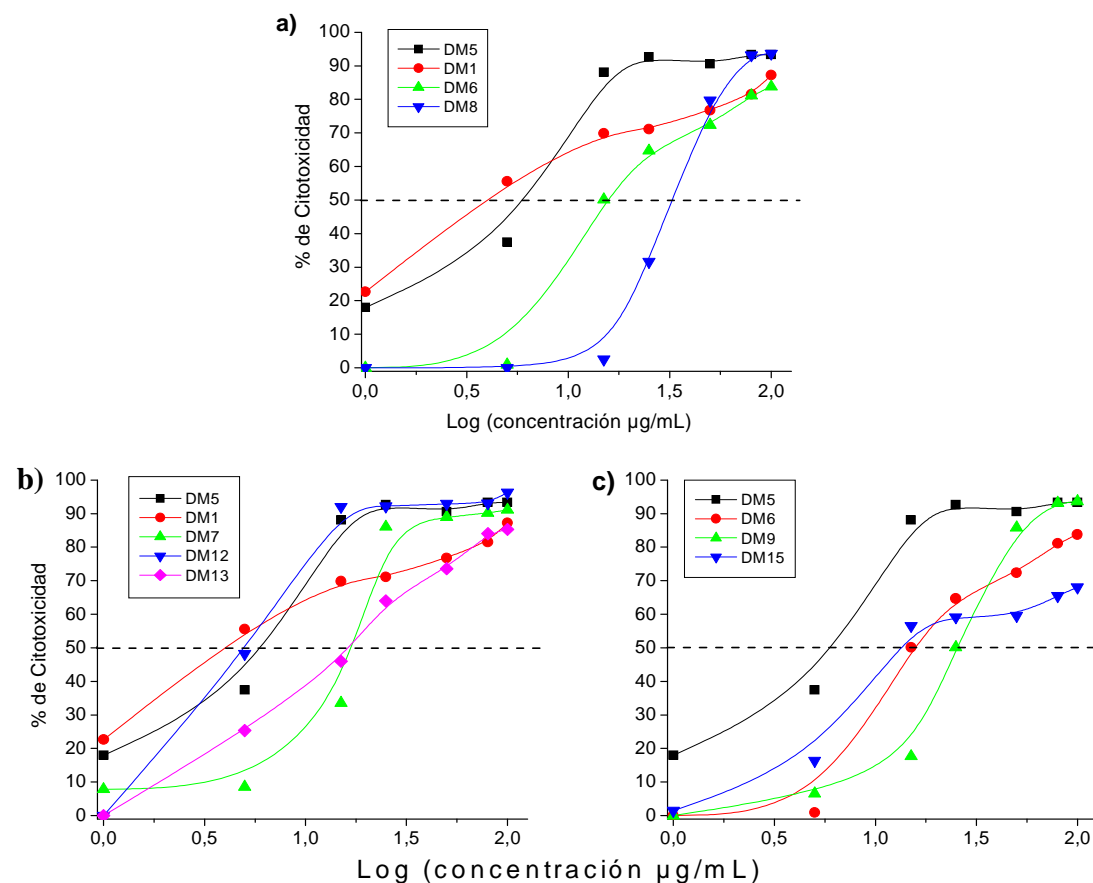


.....

posición *para* (**11**) y un grupo nitro en posición *para* (**12**); en ambas moléculas se obtuvo un aumento considerable en la potencia sobre las células tumorales y células control con respecto a la molécula patrón (**4**), siendo más evidente en la molécula **11** para ambas líneas celulares; aunque es importante destacar que la adición del grupo hidroxilo en posición *para* hace que se conserve la efectividad máxima de esta molécula alrededor del 93,65% y 88,98% (ver Anexo 2) para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 respectivamente, valor muy similar al obtenido para la molécula patrón **4**. Finalmente, la potencia farmacológica sobre las células tumorales en presencia del compuesto **12** disminuyó en comparación con la molécula **6**, observándose un incremento de la actividad citotóxica hasta tres veces sobre la línea celular SKBR3. Sin embargo, esta disminución en la potencia se ve opacada por la efectividad máxima del compuesto, debido a que este parámetro se vio disminuido en 15,8% y 15,4% para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 respectivamente, con respecto a la molécula **6** (Ver Anexo 2).

En líneas generales, se puede especular que las diferencias encontradas en los valores de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) para cada uno de los compuestos sintéticos evaluados, se deben a varios aspectos, entre los que se pueden mencionar:

- Capacidad atractora o dadora de electrones por parte de los sustituyentes en las posición 1 y 2 de los anillo A,C.
- Peso molecular de cada una de las moléculas químicas estudiadas.
- Distinta capacidad de difusión a través de la membrana celular.
- Distinta afinidad de los compuestos sintéticos por las moléculas que estén actuando como blancos de acción, en cada una de las líneas celulares tumorales y células control utilizadas en este estudio.



**Fig. 9.-** Curvas Dosis-respuesta de los compuestos pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs sobre la línea celular MCF-7, divididos en los tres conjuntos definidos en el texto: **a)** Grupo de moléculas que poseen en común un átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo C de las moléculas; **b)** Grupo de moléculas que poseen en común un grupo nitro en la posición 1 del anillo A de las moléculas; **c)** Grupo de moléculas que poseen en común la presencia de un grupo ciano en la posición 1 del anillo A de las moléculas. La línea punteada representa el 50% de citotoxicidad, el cual es el patrón para definir la potencia farmacológica de cada una de las moléculas. **\*\*Nomenclatura de las moléculas:** DM5 (4), DM1 (5), DM6 (6), DM8 (7), DM7 (8), DM12 (9), DM13 (10), DM9 (11) y DM15 (12).

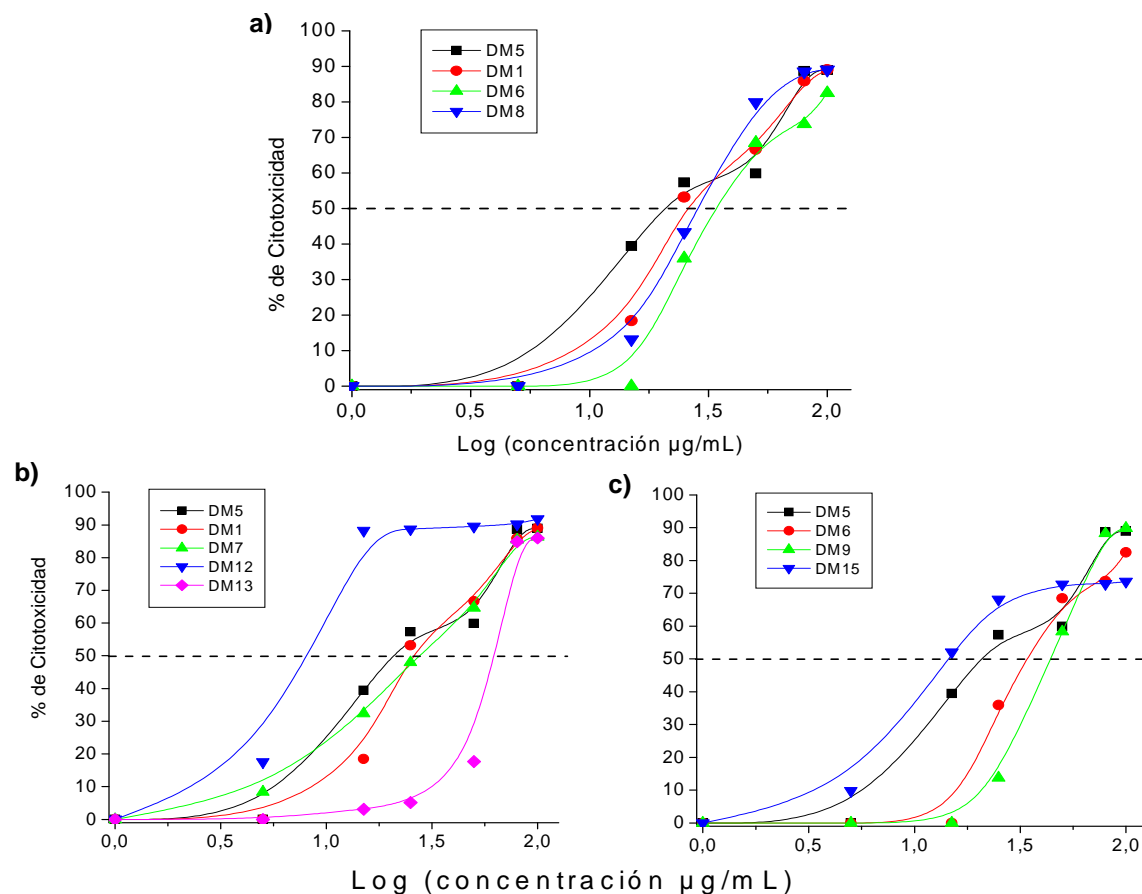
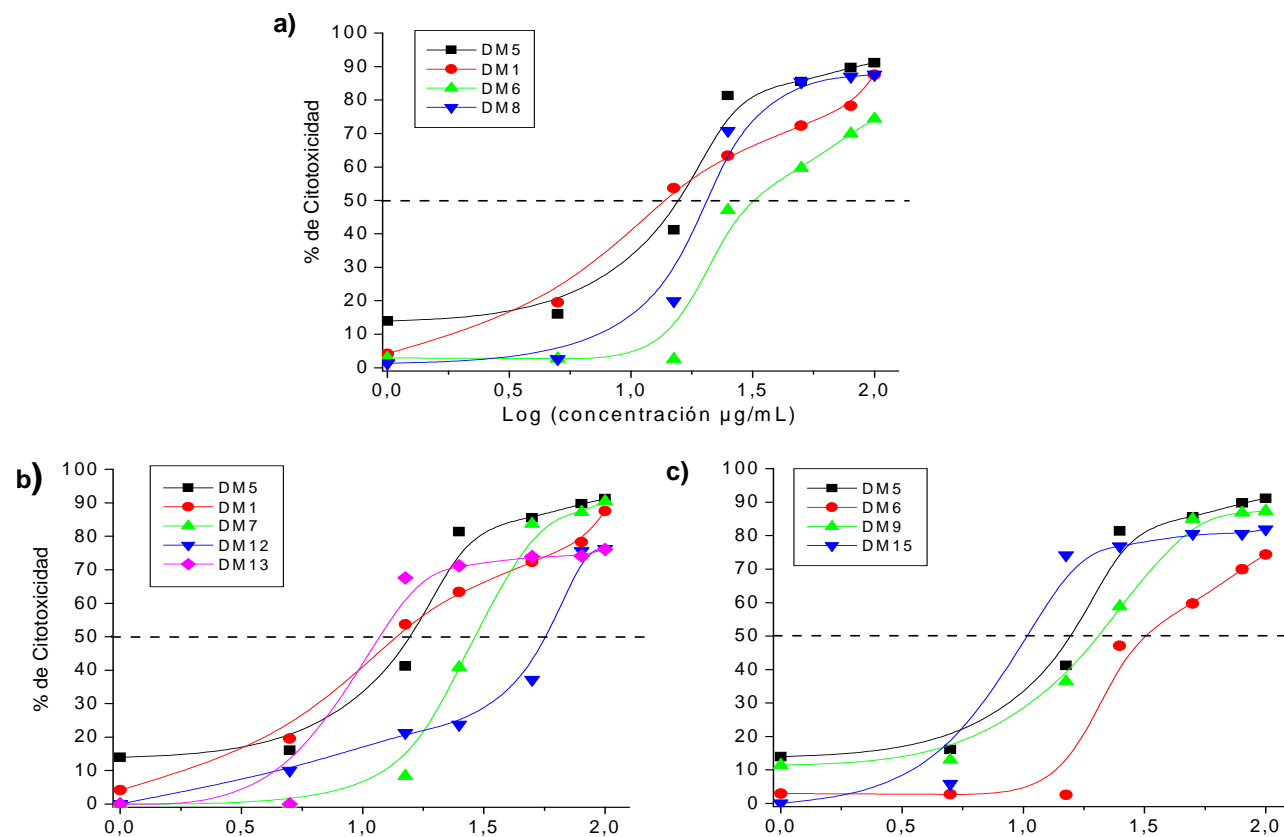


Fig. 10.- Curvas Dosis-respuesta de los compuestos pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs sobre la línea celular SKBR3, divididos en los tres conjuntos definidos en el texto: **a)** Grupo de moléculas que poseen en común un átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo C de las moléculas; **b)** Grupo de moléculas que poseen en común un grupo nitro en la posición 1 del anillo A de las moléculas; **c)** Grupo de moléculas que poseen en común la presencia de un grupo ciano en la posición 1 del anillo A de las moléculas. La línea punteada representa el 50% de citotoxicidad, el cual es el patrón para definir la potencia farmacológica de cada una de las moléculas. **\*\*Nomenclatura de las moléculas:** DM5 (4), DM1 (5), DM6 (6), DM8 (7), DM7 (8), DM12 (9), DM13 (10), DM9 (11) y DM15 (12).



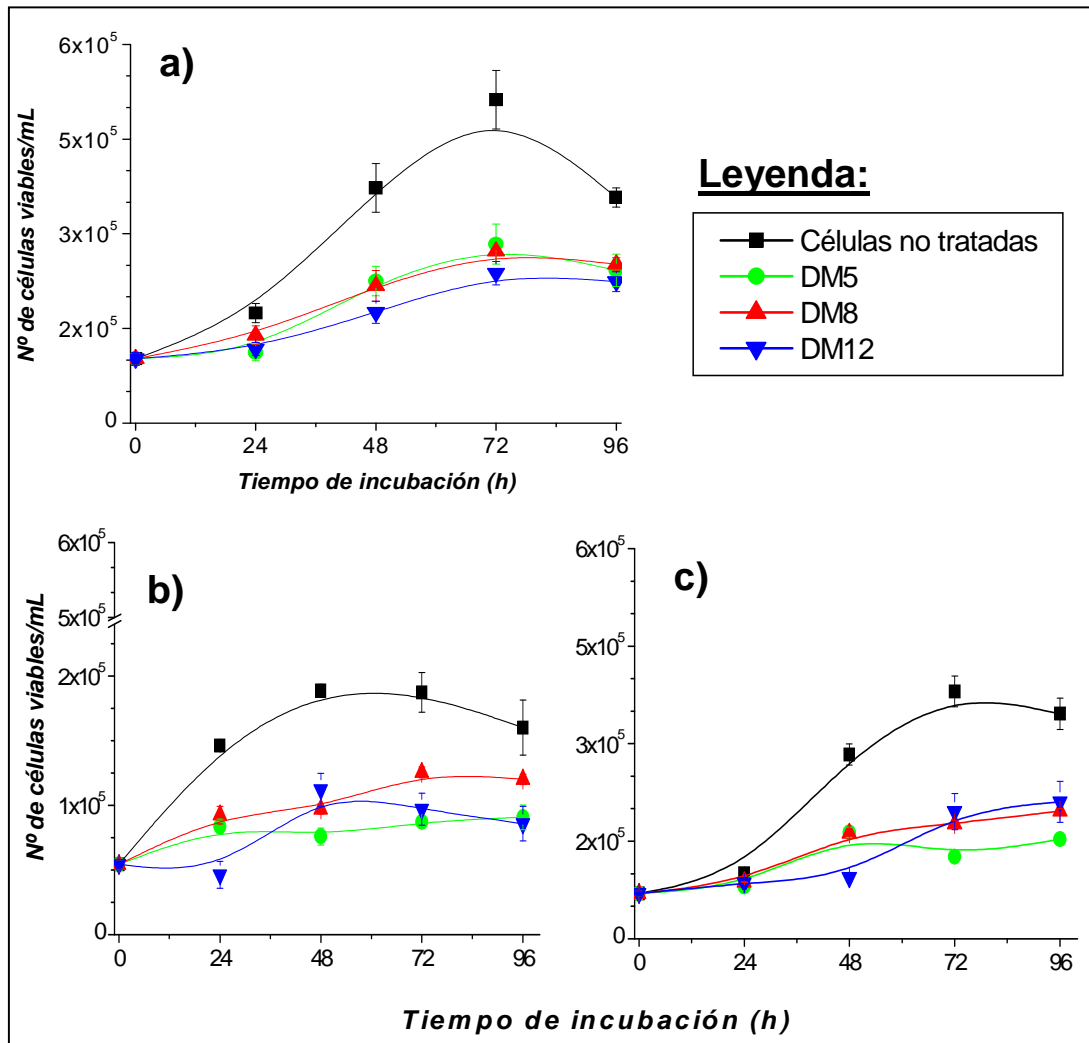
**Fig. 11.-** Curvas Dosis-respuesta de los compuestos pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs sobre células control, divididos en los tres conjuntos definidos en el texto: **a)** Grupo de moléculas que poseen en común un átomo de hidrógeno en la posición 2 del anillo C de las moléculas; **b)** Grupo de moléculas que poseen en común un grupo nitro en la posición 1 del anillo A de las moléculas; **c)** Grupo de moléculas que poseen en común la presencia de un grupo ciano en la posición 1 del anillo A de las moléculas. La línea punteada representa el 50% de citotoxicidad, el cual es el patrón para definir la potencia farmacológica de cada una de las moléculas. **\*\*Nomenclatura de las moléculas:** DM5 (4), DM1 (5), DM6 (6), DM8 (7), DM7 (8), DM12 (9), DM13 (10), DM9 (11) y DM15 (12).



#### **5.4.- EFECTO CITOTÓXICO DEL GRUPO 2,4-DAr-THQs SOBRE LA TASA DE CRECIMIENTO CELULAR:**

Para la evaluación del efecto citotóxico del grupo 2,4-DAr-THQs sobre la proliferación celular en las líneas tumorales de cáncer de mama humano, se seleccionaron solo tres compuestos, que de cierta manera abarcan todo el espectro de actividad del grupo evaluado. Los compuestos seleccionados fueron el DM5 (**4**), el cual se mantuvo como molécula patrón y los compuestos que exhibieron la mayor y menor actividad citotóxica en ambas líneas tumorales, siendo estos el compuesto **9** y **7** respectivamente. La evaluación del efecto citotóxico se determinó por conteo de las células en cámara de Neubauer, haciendo uso de la tinción con el colorante azul de tripano. La concentración utilizada de los compuestos fue la  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtenida para cada uno de ellos, sobre cada línea celular. Como se muestra en la Figura 12, se puede observar que para las dos líneas tumorales (MCF-7 y SKBR3) y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos, la  $CI_{50}$  obtenida para cada uno de los compuestos es capaz de inhibir aproximadamente la mitad de la población celular en estudio, tal como la define Alzamora y colaboradores (2007).

En cuanto a las tendencias que presentan las curvas de proliferación celular, se observa una diferencia en el número de células viables para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 con respecto al control. Esta diferencia puede deberse a factores intrínsecos de las mismas líneas celulares, puesto que la línea celular SKBR3 ostenta una sobreexpresión del gen HER2/neu y por lo tanto los niveles de esta oncoproteína se encuentran elevados; esto trae como consecuencia, según lo afirmado por Korkaya y colaboradores (2008), que se aumente la tasa de proliferación celular de tres a cinco veces. Aunque los valores obtenidos no confirman este supuesto, es evidente que la sobreexpresión de este gen en la línea celular SKBR3 genera una mayor proliferación celular comparada con la línea celular MCF-7, la cual expresa niveles fisiológicos o basales de dicha oncoproteína (Vázquez y col., 2007).



**Fig. 12.-** Efecto de los compuestos DM5, DM8 y DM12 del grupo 2,4-DAr-THQs en la proliferación celular de: **a)** Cultivos primario de fibroblastos dérmicos humanos (células control), **b)** células tumorales MCF-7 y **c)** células tumorales SKBR3, en un intervalo de 96 horas. Se puede observar una inhibición en la proliferación celular para las dos líneas celulares tumorales y células control tratadas con los tres compuestos seleccionados: DM5 (línea verde), DM8 (línea roja) y DM12 (línea azul), respecto a las células no tratadas (línea negra). Los resultados obtenidos son el promedio de tres ensayos realizados de forma independiente, calculando su respectiva desviación estándar ( $\pm$ DS).



.....

### 5.5.- RESPUESTA DE TRES MOLÉCULAS PERTENECIENTES AL GRUPO 2,4-DAR-THQs EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS ANTITUMORALES:

Finalmente, una vez descritas algunas de las propiedades farmacológicas, así como los efectos citotóxicos del grupo de moléculas 2,4-DAR-THQs, se procedió a evaluar su respuesta a la combinación con los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina. Para ello fueron seleccionados los compuestos **4**, **7** y **9**; colocándolos en presencia de los fármacos antitumorales en proporción 1:1 según lo descrito en la metodología. Los índices de combinación (IC), curvas dosis-respuesta e isobogramas serán mostrados a continuación y para fines prácticos se presentarán para cada línea celular.

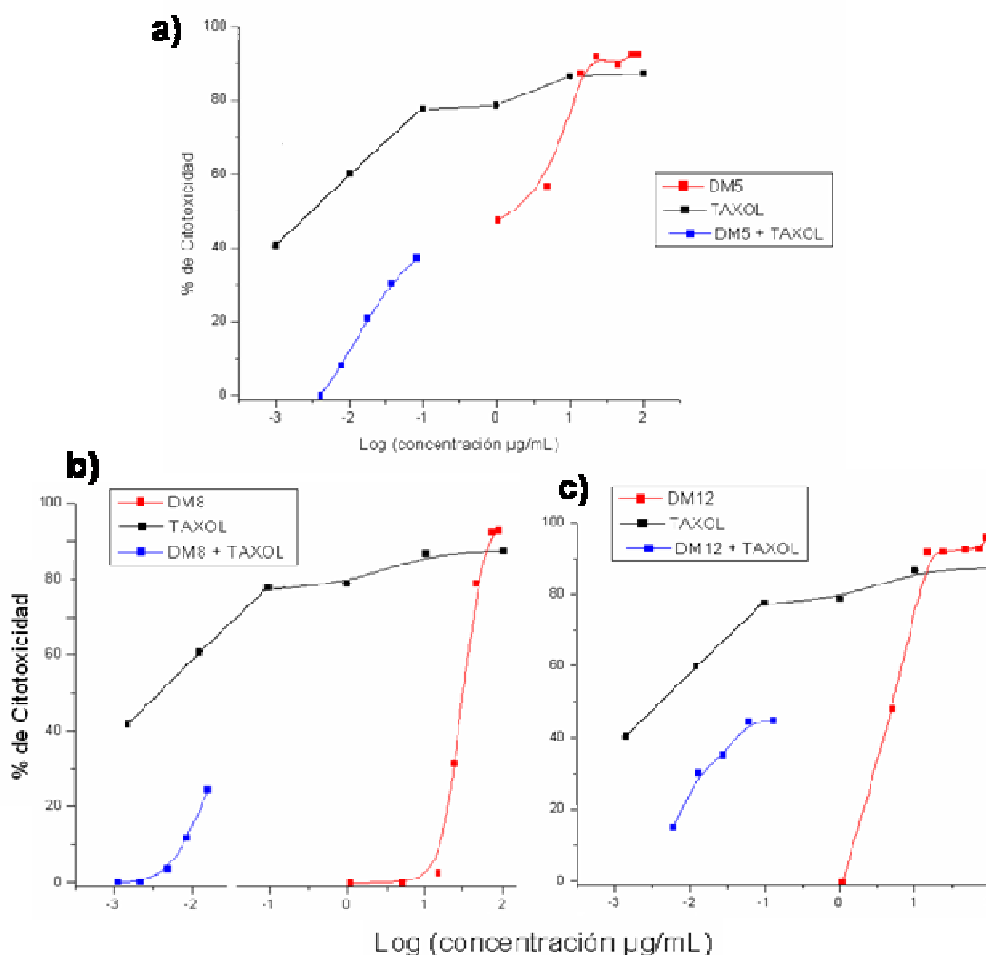
Los resultados obtenidos para la línea celular MCF-7 son mostrados en la Tabla 5, observándose que las combinaciones realizadas generan, según lo descrito por Chou y Martin (2005), un *antagonismo fuerte a muy fuerte*, dado a que los índices de combinación obtenidos en su mayoría son mayores a 3,3, exceptuando la combinación DM12 + Taxol la cual origina un antagonismo débil a moderado. El antagonismo puede definirse como la interacción de compuestos químicos, que conlleva a la disminución de los efectos de uno o ambos compuestos (Baños y March, 2002).

**Tabla 5.-** Índices de combinación (CI) entre los Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAR-THQs y los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina obtenidos para la línea celular MCF-7.

	Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAR-THQs		
	(4) DM5	(7) DM8	(9) DM12
TAXOL	39,80	56,70	1,20
GEMCITABINA	24,10	20,67	44,02

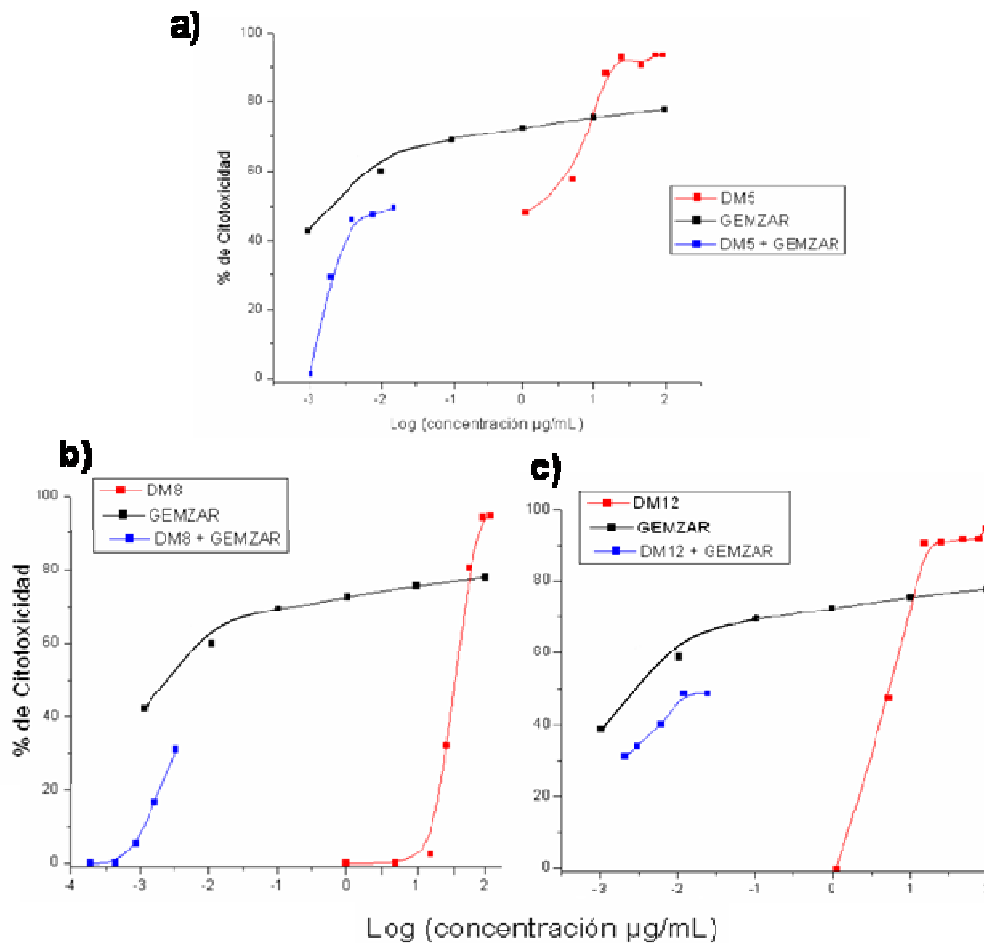


En este caso, los tres compuestos de origen sintético utilizados para la combinación de fármacos resultaron ser moléculas antagonistas de la actividad citotóxica de los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina, debido a que al comparar las curvas dosis-respuestas (Fig. 13 y 14) se puede observar que es necesaria una concentración de aproximadamente  $5 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$  (combinaciones con Taxol) y  $1 \times 10^{-3} \mu\text{g/mL}$  (combinaciones con Gemcitabina) para lograr inhibir en casi un 90% eficacia máxima de los fármacos antitumorales. Por tal motivo, pueden definirse a estas moléculas pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs como antagonistas en combinación con fármacos antitumorales sobre la línea celular MCF-7.



**Fig. 13.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular MCF-7. **a)** Combinación DM5 + Taxol; **b)** Combinación DM8 + Taxol; **c)** Combinación DM12 + Taxol.





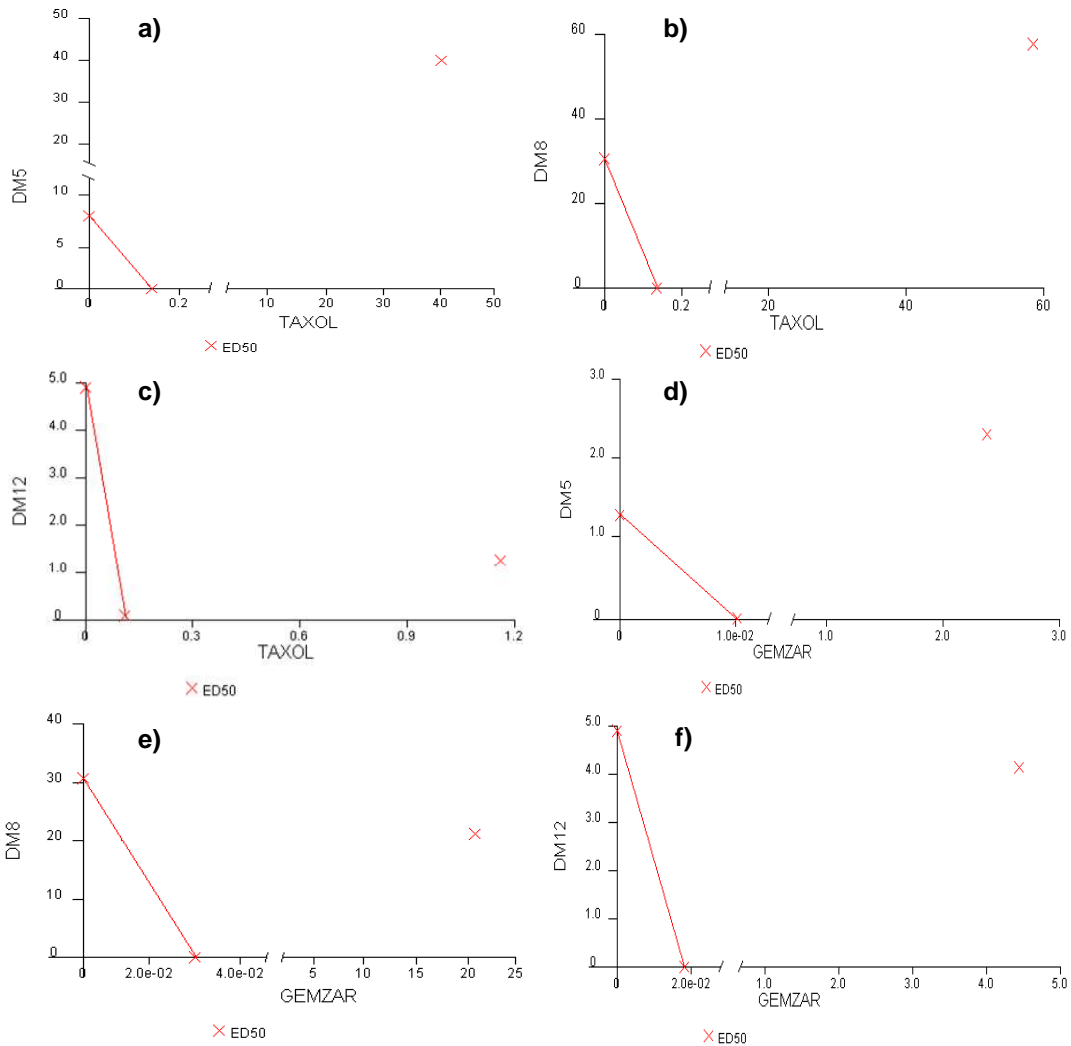
**Fig. 14.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre la línea celular MCF-7. **a)** Combinación DM5 + Gemcitabina; **b)** Combinación DM8 + Gemcitabina; **c)** Combinación DM12 + Gemcitabina.

Adicionalmente, al observar los Isobogramas obtenidos para estas combinaciones (Fig.15), se puede ratificar el comportamiento antagónico que presentan estas moléculas sintéticas en presencia de los fármacos antitumorales. Estos gráficos muestran en cada eje los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para los compuestos químicos y fármacos evaluados, trazando una línea recta entre estos dos valores que indica el carácter aditivo de la mezcla. Valores por debajo de esta línea reflejan características sinérgicas de la combinación, ocurriendo lo contrario para valores por encima de la línea, los cuales reflejan el antagonismo de la combinación realizada. La característica



## Resultados y Discusión

aditiva, sinérgica o antagónica, se encuentra representada por el valor de CI calculado a un valor de dosis efectiva 50% ( $ED_{50}$ ) que es lo mismo a la  $CI_{50}$ , para cada una de las combinaciones.



**Fig. 15.-** Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea celular MCF-7. **a)** DM5 + Taxol; **b)** DM8 + Taxol; **c)** DM12 + Taxol; **d)** DM5 + Gemcitabina; **e)** DM8 + Gemcitabina; **f)** DM12 + Gemcitabina.



Al evaluar las combinaciones de compuestos sintéticos con los fármacos antitumorales sobre la línea celular SKBR3, se evidenció la tendencia contraria a la línea celular no mutada en el gen p53 y que no sobre expresa el encogen HER2/neu (MCF-7). Para esta línea celular se obtuvieron índices de combinación (Tabla 6) que encuentran por debajo del valor 1 que indica aditividad, definiéndose por lo tanto interacciones sinérgicas entre los compuestos químicos.

**Tabla 6.-** Índices de combinación (CI) entre los Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAr-THQs y los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina obtenidos para la línea celular SKBR3.

	Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAr-THQs		
	(4) DM5	(7) DM8	(9) DM12
TAXOL	0,03	0,21	0,10
GEMCITABINA	0,004	0,65	0,02

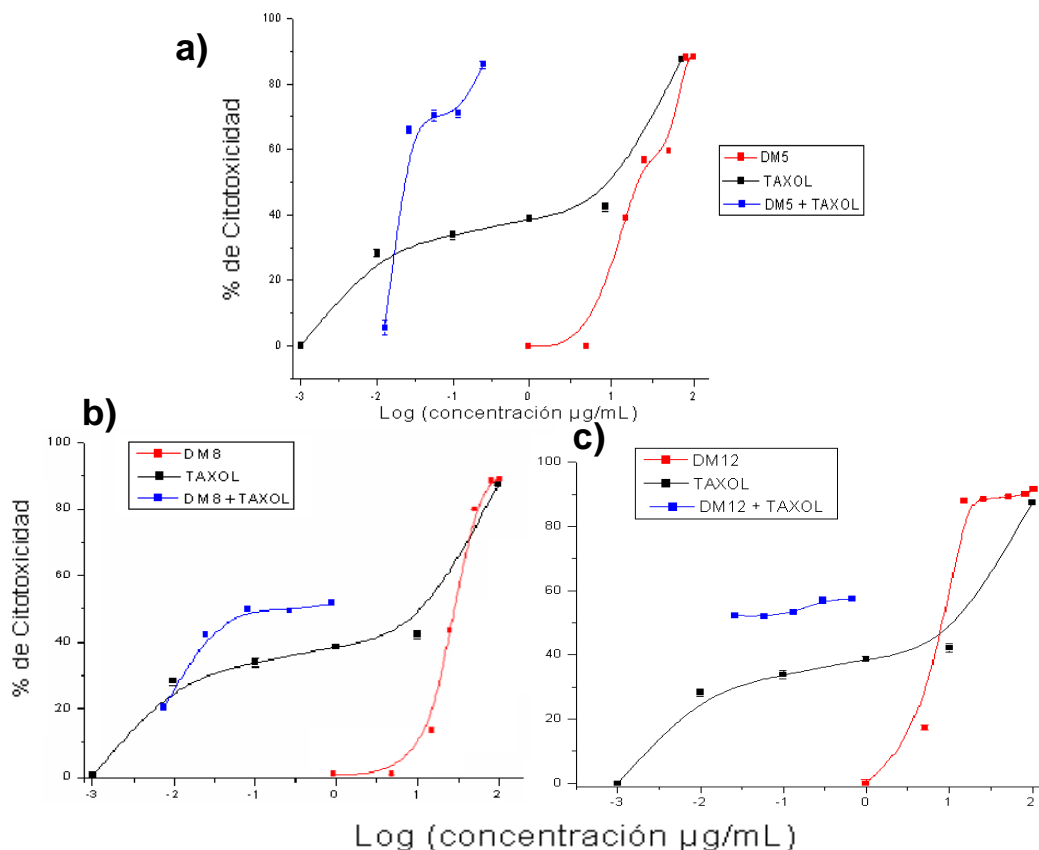
El sinergismo se define como toda interacción que da lugar a un aumento del efecto de uno o más compuestos químicos (Baños y March, 2002). En base a los valores de CI obtenidos, se pueden definir las siguientes interacciones:

- I. La combinación del compuesto DM5 con los fármacos Taxol y Gemcitabina define un *sinérgismo muy fuerte* (Fig. 18a y 18d), dado a que se cumple la relación  $IC < 0,1$ . Al observar las curvas dosis-respuesta de estas combinaciones (Fig. 16 y 17), se muestran dos tendencias; para la combinación del compuesto DM5 + Taxol (Fig. 16a) se obtuvo una clara potenciación del compuesto DM5 en presencia del fármaco antitumoral, representada por el desplazamiento de la curva sigmoide del compuesto **4** hacia la izquierda del gráfico, lo que se traduce en una disminución en la concentración del compuesto de 100  $\mu\text{g/mL}$  a 0,186  $\mu\text{g/mL}$  para obtener un porcentaje de citotoxicidad cercano al 90% para ambos fármacos. Esta potenciación pudo haberse obtenido gracias a dos factores: 1) la característica hidrofóbica y el tamaño reducido de la molécula en comparación con el Taxol, le proporciona una buena difusión a través de la membrana celular,



## Resultados y Discusión

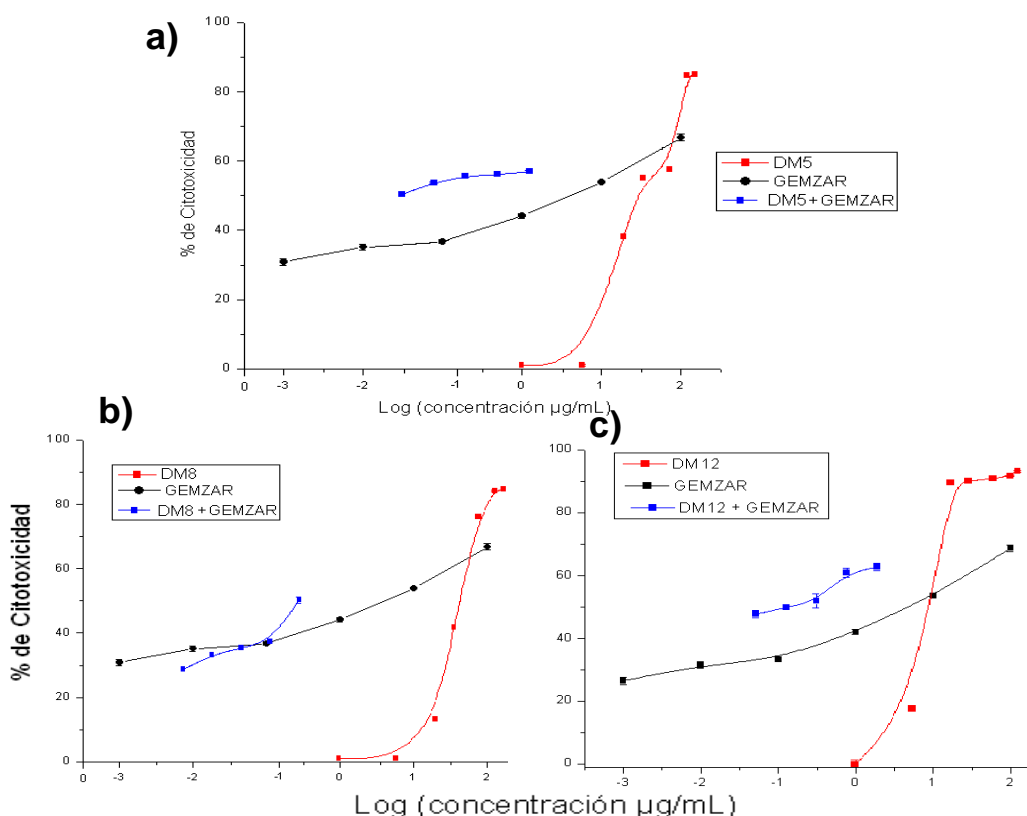
ingresando con facilidad al interior celular y potenciando la acción citotóxica que efectúan las moléculas de Taxol; 2) la mutación en el gen que codifica la proteína p53 y la sobreexpresión de la oncoproteína HER2/neu que presentan estas células, favorecen un incremento en la proliferación celular, lo que hace más quimiosensibles a estas células. Pero sin duda alguna, este resultado es excelente para posibles avances en las poliquimioterapias de tumores mamarios, dado a que se disminuyen las dosis de los compuestos involucrados, sin afectar la efectividad citotóxica de los mismos.



**Fig. 16.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular SKBR3. **a)** Combinación DM5 + Taxol; **b)** Combinación DM8 + Taxol; **c)** Combinación DM12 + Taxol.



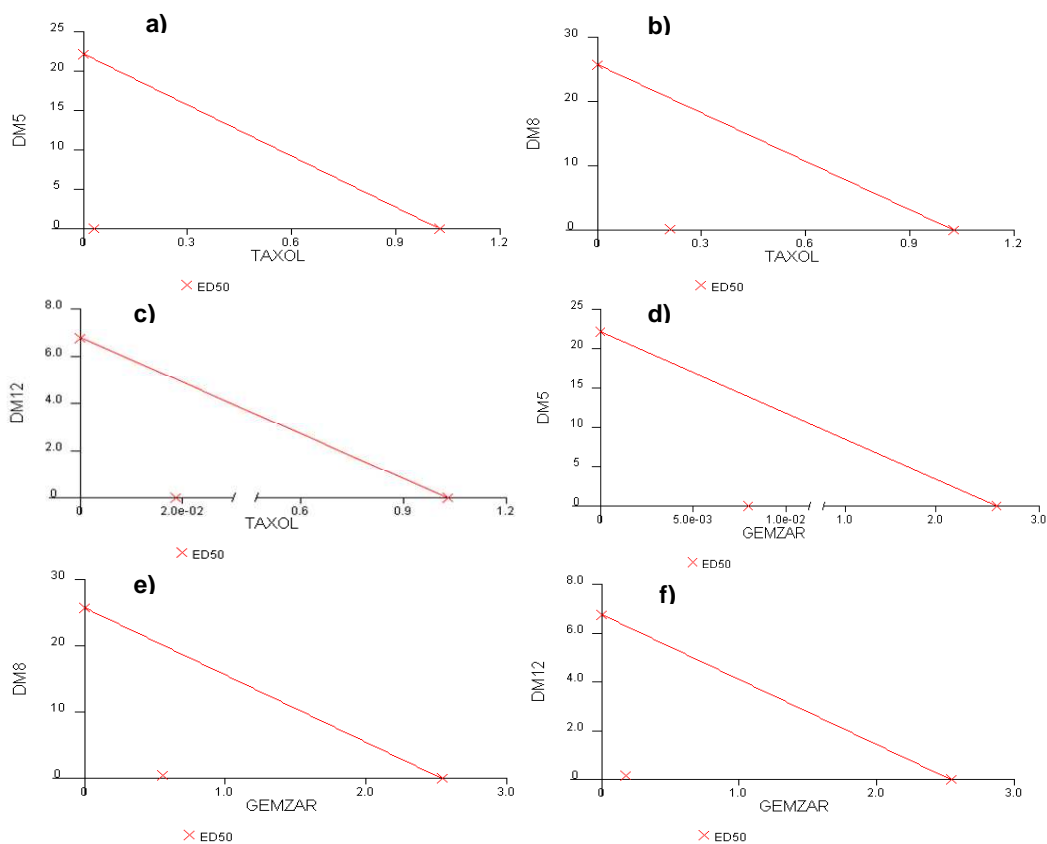
Con respecto a la tendencia obtenida para la combinación DM5 + Gemcitabina (Fig. 17a), se evidencia una potenciación de los dos compuestos involucrados. Esta doble potenciación se manifiesta por el desplazamiento de la curva sigmoide de la mezcla hacia la izquierda del gráfico y la ubicación de la misma por encima de la curva sigmoide del fármaco; aunque la efectividad máxima disminuyó con respecto al compuesto DM5, se puede definir el efecto potenciador, ya que al observar los valores mostrados en el Anexo 2, para este compuesto a valores de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se obtuvo actividad citotóxica alguna, y para el caso de la Gemcitabina, a las concentraciones utilizadas en la combinación se aumentó la actividad en aproximadamente 10% con respecto a la actividad del fármaco solo. Un resultado muy similar se obtuvo con la combinación DM12 + Gemcitabina, definiendo esta interacción como un *sinergismo muy fuerte* (Fig. 18f).



**Fig. 17.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre la línea celular SKBR3. **a)** Combinación DM5 + Gemcitabina; **b)** Combinación DM8 + Gemcitabina; **c)** Combinación DM12 + Gemcitabina.



- II. La segunda interacción que se obtuvo para esta línea celular fue un *sinergismo fuerte* para las combinaciones con los compuestos DM8 y DM12 con el fármaco Taxol (Fig. 18b y 18c). En ambos casos se obtuvieron las mismas tendencias ya descritas anteriormente; la mezcla DM8 + Taxol generó una potenciación para el compuesto DM8 en presencia del Taxol (Fig. 16b) y en cuanto a la combinación DM12 + Taxol ocurrió una doble potenciación (Fig. 16c). Aunque es importante destacar, que estos sinergismos solo fueron efectivos en términos de aumento de la potencia farmacológica de la mezcla, debido a que la efectividad máxima disminuyó en casi 50% con respecto a los compuestos solos.
- III. Por último, la combinación del compuesto DM8 con el fármaco Gemcitabina fue la menos efectiva de los seis casos estudiados, dado a que el valor de IC fue el más cercano a la aditividad (ver Tabla 6). Según Chou y Martin (2005), el índice de combinación para esta mezcla define una interacción de tipo *sinergismo* (Fig. 18e), representado por el desplazamiento de la curva sigmoide para el compuesto DM8 hacia la izquierda del gráfico (Fig. 17b), pero al observar la tendencia de la misma, es posible evidenciar un comportamiento muy similar a la curva del fármaco Gemcitabina, con la disminución de su efectividad máxima, por lo que podría inferirse que el compuesto DM8 está actuando como un compuesto antagónico de la actividad citotóxica de la Gemcitabina sobre la línea celular SKBR3.



**Fig. 18.-** Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre la línea celular SKBR3. **a)** DM5 + Taxol; **b)** DM8 + Taxol; **c)** DM12 + Taxol; **d)** DM5 + Gemcitabina; **e)** DM8 + Gemcitabina; **f)** DM12 + Gemcitabina.

Como último aspecto a evaluar en este trabajo, se estudiaron los efectos de las combinaciones entre los compuestos sintéticos y fármacos antitumorales sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos. Los valores de IC se presentan en la Tabla 7 y en base a ellos es posible definir dos tipos de interacciones: Las moléculas sintéticas **4** y **7** en combinación con los fármacos Taxol y Gemcitabina son capaces de establecer una interacción *antagónica*; por el contrario, la molécula **9** en combinación con los fármacos de referencia establece una interacción *sinérgica* sobre las células control. Los grados de interacción y otras características relacionadas con estas combinaciones serán descritos a continuación.



Los patrones antagonísticos descritos anteriormente para las moléculas **4** y **7** en presencia de los fármacos de referencia pueden ser divididos en dos categorías. Primeramente, los resultados mostrados en la Tabla 7 para la combinación de la molécula DM5 con los fármacos Taxol y Gemcitabina, definen un *antagonismo fuerte a muy fuerte* según la clasificación propuesta por Chou y Martin (2005) (Fig. 21a y 21d), el cual, al observar las curvas sigmoides para ambos casos (Fig. 19a y 20a) presenta dos características bien definidas. La curva dosis-respuesta obtenida para la combinación de la molécula **4** con el fármaco Taxol muestra una tendencia muy similar a la curva del Taxol como agente solo, pero con una actividad citotóxica mucho menor, en la cual la efectividad máxima del fármaco de referencia disminuyó en casi 60%; por lo tanto, podría especularse que el compuesto **4** se comporta como un compuestos antagonista de la actividad citotóxica del fármaco Taxol.

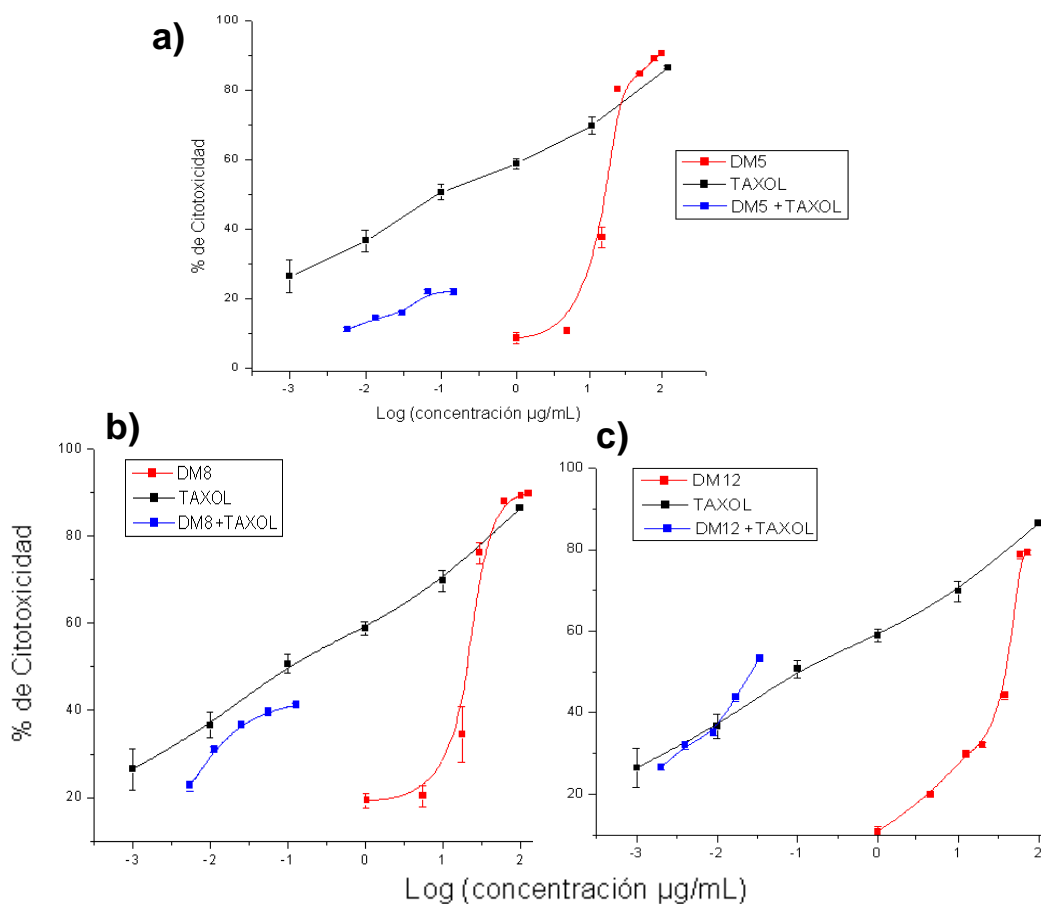
**Tabla 7.-** Índices de combinación (CI) entre los Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAr-THQs y los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina obtenidos para los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos.

	Compuestos sintéticos del grupo 2,4-DAr-THQs		
	(4) DM5	(7) DM8	(9) DM12
TAXOL	60,13	3,15	0,44
GEMCITABINA	24,91	3,35	0,53





Con respecto a la combinación del compuesto **4** con el fármaco Gemcitabina, al observar las curvas dosis-respuesta (Fig. 20a) se evidencia una tendencia similar a la del compuesto sintético como agente simple, y al igual que el caso anterior, la efectividad máxima obtenida con la combinación de los compuestos químicos se encuentra disminuida en aproximadamente 60%. En este caso (dado a la forma de la curva D-R) y a diferencia de la combinación con Taxol, la Gemcitabina es la que parece estar actuando como molécula antagónica de la actividad del compuesto DM5. Resultados muy similares a los ya descritos, se obtuvieron para las combinaciones de la molécula DM8 con los fármacos de referencia (Fig. 19b y 20b), aunque para este caso en específico, la interacción según los índices de combinación se define como *antagonismo* (Fig. 21b y 21e). La disminución en el grado de antagonismo, se explica por la cercanía o similitud de las curvas sigmoideas obtenidas para las combinaciones con la curva sigmoide obtenida para el Taxol y Gemcitabina como agentes simples, por tal motivo, puede especularse que en estos casos la actividad del compuesto sintético es muy baja y en su mayoría la actividad citotóxica es aportada por los fármacos antitumorales. Ahora, como referencia las curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los fármacos con la molécula **7**, se puede hablar de un efecto aditivo en lugar de un efecto antagónico, es decir, que los efectos combinados de los dos compuestos químicos dan como resultado una actividad similar a la de uno de los compuestos como agentes simples.



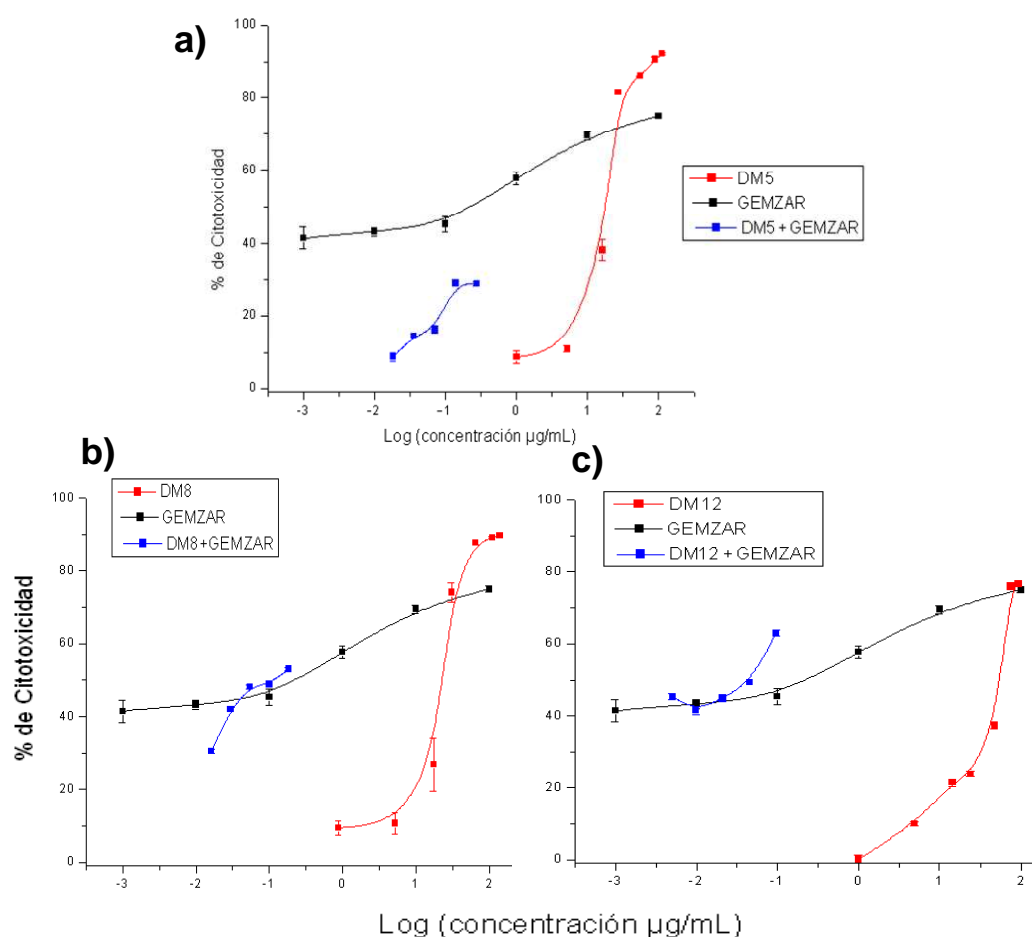
**Fig. 19.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Taxol sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. **a)** Combinación DM5 + Taxol; **b)** Combinación DM8 + Taxol; **c)** Combinación DM12 + Taxol.

Por último, se describirán los efectos de la combinación de la molécula **9** en presencia de los fármacos Taxol y Gemcitabina sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. A diferencia de lo descrito con anterioridad, estas combinaciones generan interacciones de tipo *sinérgicas* (Fig. 21c y 21f) según los valores de IC registrados. Al observar las curvas sigmoideas para ambos casos, se evidencian tendencias muy similares a las derivadas para el compuesto sintético como agente simple, por lo que se podría pensar en una interacción potenciadora por parte de los fármacos hacia la acción citotóxica del compuesto sintético. Sin embargo, esta aseveración puede ser descartada por dos aspectos importantes a señalar. Primeramente los compuestos

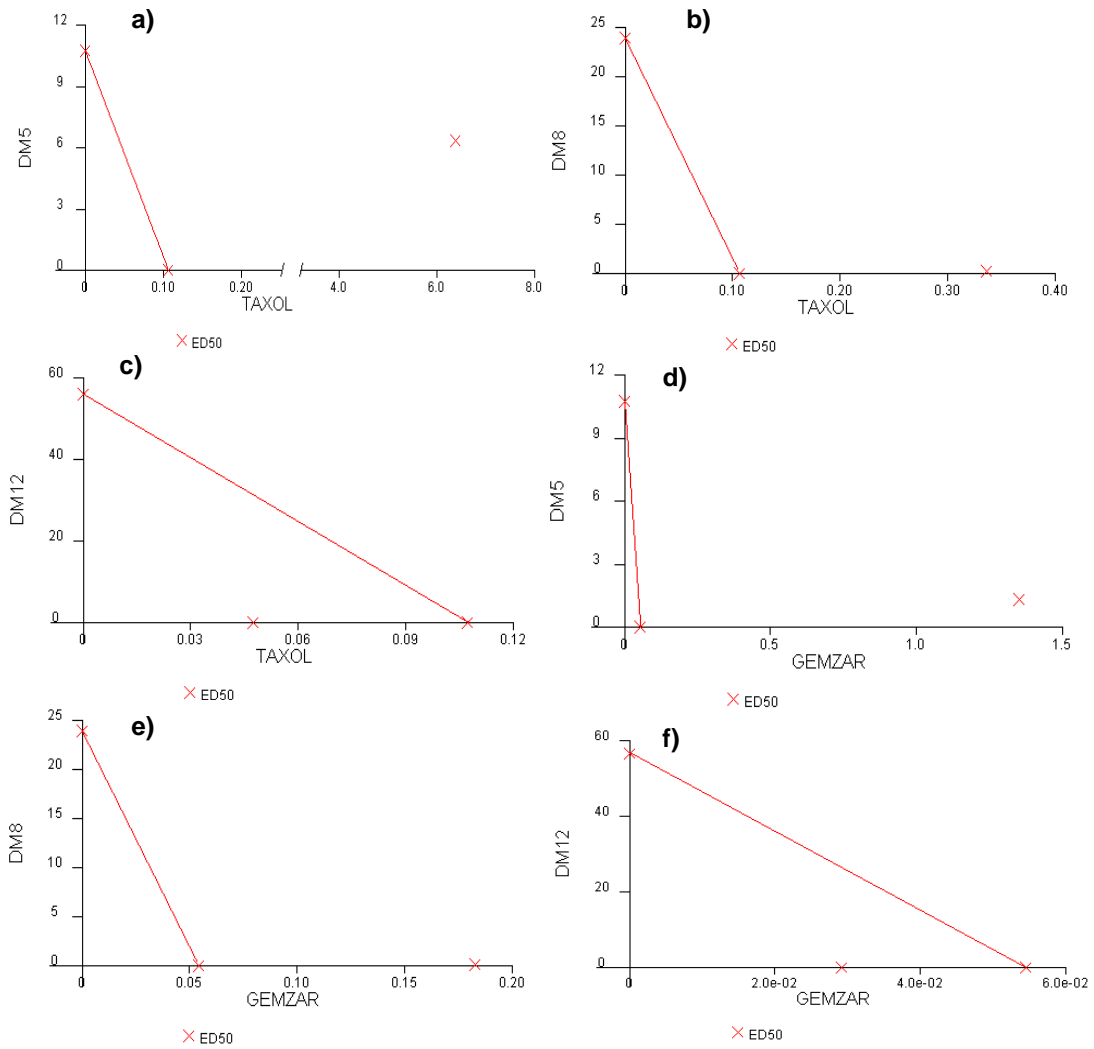


## Resultados y Discusión

químicos como agentes combinados, generan una actividad citotóxica con una efectividad máxima disminuida con respecto a la tendencia del compuesto **9** como agente simple, por lo que podría decirse que la potenciación no fue del todo efectiva. Por otra parte, los efectos citotóxicos por parte de la combinación de los compuestos químicos son muy similares a los obtenidos para ambos fármacos como agentes simples. En resumen, para este caso también es posible plantear que en lugar de un sinergismo, la interacción de la molécula **9** con los fármacos de referencia Taxol y Gemcitabina origina una interacción aditiva sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos.



**Fig. 20.-** Curvas dosis-respuesta para las combinaciones de los compuestos sintéticos con el fármaco antitumoral Gemcitabina sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. **a)** Combinación DM5 + Gemcitabina; **b)** Combinación DM8 + Gemcitabina; **c)** Combinación DM12 + Gemcitabina.



**Fig. 21.-** Isobogramas obtenidos para cada una de las combinaciones realizadas sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. **a)** DM5 + Taxol; **b)** DM8 + Taxol; **c)** DM12 + Taxol; **d)** DM5 + Gemcitabina; **e)** DM8 + Gemcitabina; **f)** DM12 + Gemcitabina.



## 6.- CONCLUSIONES

La realización del presente estudio titulado “Efecto Citotóxico del grupo 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas y su respuesta en combinación con fármacos antitumorales sobre células de cáncer de mama humano” permite concluir lo siguiente:

- Todos los compuestos pertenecientes al grupo 2,4-DAr-THQs muestran una inhibición de la viabilidad celular sobre las líneas tumorales (MCF-7, SKBR3) y células control, conforme aumenta la dosis de los compuestos, es decir, presentan una tendencia dosis - respuesta.
- La citotoxicidad obtenida mediante la exposición a los compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs sobre cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos, en general es menor a la obtenida sobre las líneas tumorales.
- Las moléculas **4**, **5**, **6**, **8**, **9** y **12** presentan una alta selectividad hacia la acción citotóxica, específicamente sobre células tumorales de la línea MCF-7.
- Al evaluar el efecto de la molécula **9** sobre las dos líneas tumorales y cultivos primarios de fibroblastos dérmicos se pudo establecer como la molécula más activa del grupo 2,4-DAr-THQs, con un rango de 4,92 a 6,77  $\mu\text{g/mL}$  para las líneas celulares MCF-7 y SKBR3 respectivamente. Adicionalmente, fue la molécula que presentó menor actividad citotóxica sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos con una  $\text{CI}_{50}$  de 58,55  $\mu\text{g/mL}$ .
- Las moléculas **5**, **9** (para la línea celular MCF-7) y **12** (para la línea celular SKBR3) a pesar que presentan valores de  $\text{CI}_{50}$  mayores a los obtenidos para los fármacos de referencia Adriamicina, Taxol y Gemcitabina, presentan mejores índices de selectividad, por lo que su actividad citotóxica es más selectiva sobre las células tumorales con respecto a las células normales.



- Una vez realizado el Screenig farmacológico del grupo 2,4-DAr-THQs, se puede definir al compuesto DM12 como la estructura química más importante de toda la serie en cuanto a la acción citotóxica sobre células de cáncer de mama humano. Esto se debe a la alta selectividad mostrada sobre las líneas tumorales, que fue de 11,9 y 8,64 para la línea celular MCF-7 y SKBR3 respectivamente; adicionalmente, se encontró que esta molécula presenta un mayor margen de seguridad en cuanto a la actividad citotóxica sobre células normales en comparación con los fármacos de referencia Taxol y Adriamicina en las dos líneas tumorales estudiadas.
- En cuanto a la relación estructura actividad, se obtuvo que la sustitución de un grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición 1 del anillo A de la molécula patrón (**4**), genera la mayor actividad citotóxica sobre la línea celular MCF-7; aunque en general, la sustitución que origina la mayor actividad citotóxica sobre las dos líneas tumorales, es el cambio por un grupo nitro en la posición 1 del anillo A y un grupo nitro en posición *orto* en la posición 2 del anillo C en la molécula patrón (**4**). Adicionalmente, se puede evidenciar que la sustitución de grupos amino (**7**) y ciano (**11**) disminuyen en promedio unas tres veces la actividad citotóxica sobre ambas líneas tumorales con respecto a la molécula patrón (**4**).
- En términos de efectividad, la combinación del compuesto **4** con el fármaco antitumoral Taxol sobre la línea celular SKBR3 presentó un sinergismo muy fuerte de tipo potenciación, lo que se tradujo en una disminución de la concentración de 100 µg/mL a 0,186 µg/mL para obtener una efectividad máxima cercana al 90% para ambos fármacos. De igual manera, la combinación del compuesto **4** con los fármacos Taxol y Gemcitabina sobre los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos, presentaron una interacción antagónica importante, dado a que se disminuyó en casi un 60% la actividad citotóxica que poseían ambos fármacos como agentes simples.



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

Allevato, M. 2008. Antineoplásicos. *Act Terap Dermatol.* **31**: 6-16.

Althuis, M., Dozier, J., Anderson, W., Devesa, S. y Brinton, L.. 2005. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol.* **34**: 405-12.

Alzamora, L., Colona, E., Acero de Mesa, N., Galán de Mera, A., Muñoz, D., Linares, F., Domínguez, M. y col. 2007. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. *Rev. peru biol.* **13**: 219-222.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K. y Watson, J. 1994. Molecular Biology of the cell. 3ª Edition, Garland Publishing Inc., New Cork, London.

Arnér, E. y Eriksson, S. 1995. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmac Ther.* **67**: 155-186.

Arvelo, F., Merentes, E. y Cotte, C. 2000. Resistencia multidroga (MDR) o pleiotropica. *Acta Cient Venez.* **51**: 45-52.

Arvelo, F., Suárez A., Galindo-Castro, I., Compagnone, R. y Usubillaga, A. 2008. Productos naturales en la terapéutica actual. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **5**: 69-72.

Baños, J., March, M. 2002. Farmacología ocular, 2da edición (en español), Ediciones UPC, pp. 87.

Blagosklonny, M. V., Toretsky, J., y Weckers, L. 1995. Geldanamycin selectively destabilizes and conformationally alters mutated p53. *Oncogene.* **11**: 933-939.



.....

Bosetti, C., Malvezzi, M., Chatenoud, L., Negri, E., Levi, F. y La Vecchia, C. 2005. Trends in cancer mortality in the Americas, 1970-2000. *Ann Oncol.* **3**: 489-511.

Caprio, V., Guyen, B., Opoku-Boahen, Y., Mann, J., Gowan, S., Kelland L., Read, M. y Neidle, S. 2000. A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo[3,2-b]quinoline. *Bioorg Med Chem Lett.* **10**: 2063–2066.

Callacondo, D., Quispe, A., Lindo, S. y Vaisberg, A. 2008. Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* “Keto Keto” en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* **25**: 380-385

Capote, L. 2006. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. *Rev. venez. Oncol.* **18**: 269-281.

Capote, L. 2008. Frecuencia del cáncer en Venezuela. *Fasciculos Coleccionables: 30 años – 30 temas de la Fundación BADAN.* Tema 2.

Chou, JC., Chou, TC. y Taladay, P. 1984. Conservation of laboratory animals by improved experimental design, generalized equations and computer analysis. *Fed Proc.* **43**: 576

Chou, JC. 1991. Quantitation of synergism and antagonism of two or more drug by computerized analysis, in *Synergism and Antagonism in Chemotherapy* (Chou TC and Rideout DC eds) pp 223-244, Academic Press, New York.

Chou TC. y Martin, N. 2005. *CompuSyn of drug combinations: PC software and user's guide: A computer program fro quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> values.* ComboSyn, Paramus, NJ.





.....

Cordell, G., Kinghorn, A. y Pezzuto, J. 1993. Separation, structure elucidation, and bioassay of cytotoxic natural products. In S. Colegate and R. Moleynaux (eds.), *Bioactive Natural products: Detection, Isolation, and Structural determination*, CRC press, Florida. pp: 198-201.

Cossman, J. y Schlegel, R. 1991. p53 in the diagnosis of human neoplasia. *J Natl Cancer.* **83**: 980-981.

Cragg, G. y Newman, D. 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Invest.* **17**: 153-63.

Donegan W y Redlich P. 1996. Breast cancer in men. *Surg Clin North Am.* **76**: 343-63

Dorey, G., Lockhart, B., Lestage, P. y Casara P. 2000. New Quinolinic Derivatives as Centrally Active Antioxidants. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**: 935-939.

Ferlay, J., Bray, F., Pisan, P. y Parkin, D. 2002. *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. Lyon: IARC CancerBase No. 5.

Filozof, C., González, C., Sereday, M., Mazza, C. y Braguinsky, J. 2001. Obesity prevalence and trends in Latin-American countries. *Obes Rev.* **2**: 99-106.

Frías, G., Hierro, S., Jiménez, J., Moreno, L. y Ruiz, R. 2007. Farmacogenómica y sus aplicaciones clínicas. *Dermatología Rev Mex.* **51**:99-111.

Furones, J. 2002. Bases científicas para el desarrollo y la utilización de los medicamentos. *Farmacología General*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.

Gran, L., Sandberg, F. y Sletten, K. 2000. *Oldenlandia affinis* (R&S) DC A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **70**: 197-203.



Giordano S, Cohen D. y Buzdar A. 2004. Breast carcinoma in men; A population-based study. *Cancer* **101**: 51-57.

Goldman, J., Th'ng, K., Park, D., Spiers, A., Lowenthal, R. y Ruutu, T. 1987. Collection, cryopreservation and subsequent viability of haemopoietic stem cells intended for treatment of chronic granulocytic leukaemia in blast-cell transformation. *Br J Haematol.* **40**: 185-195.

Goodman, L. y Gilman, A. 1996. *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. Mcgraw-hill.

Guo, Y. y Wang, J. 2008. Stimulation of taxane production in suspension cultures of *Taxus yunnanensis* by ologogalacturonides. *Afr J Biotechnol.* **7**: 1924-1926.

Heinemann, V., Hertel, L., Grindey, G. Y Plunkett, W. 1988. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* **48**: 4024-4031

Hidalgo, M. y Eckhart, S. 2001. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer I.* **93**: 178-93.

Huang, P., Chubb, S., Hertel, L., Grindey, G. y Plunkett, W. 1991. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* **51**: 6110-6117.

Huang, P. y Plunkett, W. 1992. A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. *Anal Biochem.* **207**: 163-167.

Isaacs, J., Pili, R., Qian, D., Dalrymple, S., Garrison, J., Kyprianou, N., Björk, A. Y col. 2006. Identification of ABR-215050 as lead second generation quinoline-3-carboxamide anti-angiogenic agent for the treatment of prostate cancer. *Prostate.* **66**: 1768-1778.



Jacquemond-Collet, I., Benoit, F., Mustofa, C., Valentin, A., Stanislas, E., Mallié, M. y Fourasté, I. 2002. Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Galipinine and other Tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Med.* **68**: 68-69.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M. 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* **56**: 106-130.

Khan, M. 2007. Quinoline Analogs as Antiangiogenic Agents and Telomerase Inhibitors. *Top. Heterocycl. Chem.* **11**: 213-229.

Kastan, M., Zhao, Q., El-Deiry, W., Carrier, F., Jacks, T., Welsh, W., Plunkett, B. y col. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell.* **71**: 587-597.

Kemnitzer, W., Kuemmerle, J., Jiang, S., Zhang, H., Sirisoma, N., Kasibhatla, S., Crogan-Grundy, C. y col. 2008. Discovery of 1-benzoyl-3-cyanopyrrolo[1,2-*a*]quinolines as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. Part 1: Structure-activity relationships of the 1- and 3-positions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23**: 6259-6264.

Khanna, C. y Hunter, K. 2005. Modeling metastasis *in vivo*. *Carcinogenesis*. **26**: 513-523

Knowles, M. y Selby, P. 2005. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Fourth Edition. Oxford University Press. Capítulo 1. pp: 4-6.

Korkaya, H., Paulson, A., Iovino, F y Wicha, M. 2008. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*. **27**: 6120-6130.



Kovach, J., McGovern, R., Cassady, I., Swason, S., Wald, L., Vogelstein, B. y Sommer, S. 1991. Direct sequencing from touch preparations carcinomas: analysis of p53 mutation in breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 1004–1009.

Langley, R. y Fidler, I. 2007. Tumor cell-Organ microenvironment interactions in the patogénesis of cancer metastasis. *Endocr Rev* **28**: 297-321.

Lau, D., Xue, L., Young, L., Burke, P., Cheung, A. 1999. Paclitaxel (Taxol): an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **14**: 31–36.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scout, M., Zipursky, L y col. 2004. Molecular Biology. Freeman and Company.

Luque, J. 2000. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Elsevier Science.

Malone, H. 1978. Pharmacological Approaches to natural Product Screening and Evaluation In: New Natural Product and Plant Drug with Pharmacology. *Wagner and Wolf Eds.*, New York.

Merlin, J., Barberi-Heyob, M. y Bachmann, N. 2002. *In vitro* comparative evaluation of trastuzumab (Herceptin®) combined with paclitaxel (Taxol®) or docetaxel (Taxotere®) in HER2-expressing human breast cancer cell lines ©. *European Society for Medical Oncology*.

Miller, K. y Sledge, G. 1999. Taxanes in the treatment of breast cancer: a prodigy comes of age. *Cancer Invest* **17**: 121–136.

McPherson, K., Steel, C. y Dixon, J. 2000. ABC of Breast Diseases: Breast cancer - epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. **321**: 624 – 628.



- Monga, V.; Nayyar, A.; Vaitilingam, B., Palde, P., Jhamb, S., Kaur, S., Singh, P. y col. 2004. Ring-substituted quinolines. Part 2: Syntesis and antimycobacterial activities of ring-substituted quinolinecarbohydrazide and ring-substituted quinolinecarboxamide analoges. *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 6465-6472.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Parkin, D., Whelan, S., Ferlay, J., Teppo, L. y Thomas, D. 2002. Cancer Incidence in Five Continents Vol VIII. IARC Scientific publications No 155. Lyon.
- Pearson, J. 1988. A Practical Review of Breast Anatomy and Pathology. *Journal of Diagnostic Medical Sonography.* **4**: 305-308
- Plunkett, W., Huang, P. y Gandhi, V. 1995a. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Colloq Inse.* **6**: 7-13
- Plunkett, W., Huang, P., Xu, Y. Heinemann, V., Grunewald, R., Gandhi, V. 1995b. Gemcitabine; metabolism, mechanisms of action, and self-potentialiation. *Semin Oncol* **22**: 3-10.
- Popoca, J., Aguilar, A., Alonso, D. y Villarreal, M. 1998. Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* **59**: 173-177.
- Ravelo, J. 2001. Avances en el diagnóstico del cáncer de la mama. Importancia de la pesquisa y diagnóstico precoz. Reflexiones sobre el problema en Venezuela. *Gac Méd Caracas* **109**: 418-421.



Rowley S., Anderson G. 1993. effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.* **11**: 389-393.

Ruddon, R. 2007. *Cancer biology*. Fourth edition. Oxford University Press.

Ruffa, M., Ferraro, G., Wagner, M., Calcagno, M., Campos, R. y Cavallaro, L. 2002. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J. Ethnopharmacol.* **79**: 335

Ruiz van Haperen, V., Veerman, G., Vermorken, J. y Peters, G. 1993. 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA from tumour cell lines. *Biochem Pharmacol* **46**: 762-766.

Ruiz van Haperen, V., Veerman, G., Vermorken, J. Pinedo, H. y Peters, G. 1996. Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* **51**: 911-918.

Schuurhuis, G., van Heijningen, T., Cervantes, A., Pinedo, H., de Lange, J., Keizer, H., Broxterman, H. y col. 1993. Changes in subcellular doxorubicin distribution and cellular accumulation alone can largely account for doxorubicin resistance in SW-1575 lung cancer and MCF7 breast cancer multidrug resistant tumour cells. *Br. J. Cancer.* **68**: 898-908.

Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, S. y Singh, P. 2004. Ring-substituted quinolines as potential anti-tuberculosis agents *Bioorg. Med. Chem.* **12**: 2501- 2508.

Vázquez, A., Colomer, R. y Menendez, J. 2007. Protein array technology to detect HER2 (*erbB-2*)-induced 'cytokine signature' in breast cancer. *European Journal of Cancer.* **43**: 1117-1124.



Velazco, A., Lorenzo, P., Serrano, J., Fernando, A. 1996. Farmacología. Capítulo 4. McGRAW-Hill – Interamericana de España.

Wallace, O., Lauwers, K., Jones, S. y Dodge, J. 2003. Tetrahydroquinoline-Based Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 1907-1910.

**Consultas en línea:**

Breast cancer line database. 2008. University of Texas, M.D. Anderson Cancer Center. <http://www.mdanderson.org/departments/cancerbiology/dIndex.cfm?pn=31062032-B0EB-11D4-80FB00508B603A14>. [Consulta: 26 de Septiembre de 2008].

Martínez, A. 2003. Aceites Esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia – Medellín. <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf> (28/04/2009). [Consulta: 25 de marzo de 2009]

Nagourney, R. 2001. Rational Therapeutics company. <http://www.rationaltherapeutics.com/files/docs/samples/Sample%20Breast.pdf> [Consulta: 23 de Octubre de 2008].

Salazar, G. 2008. Artículo de revisión bibliográfica: Farmacogenética en el tratamiento oncológico. Año 4, Número 20. [http://www.infarmate.org/pdfs/julio\\_agosto08/oncologia.pdf](http://www.infarmate.org/pdfs/julio_agosto08/oncologia.pdf). [Consulta: 09 de noviembre de 2008].



Wallace, O. 2005. Tetrahydroquinoline derivatives for the inhibition of osteoporosis, estrogen dependent breast cancer, endometriosis and uterine fibrosis. United States Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN, US). <http://www.freepatentsonline.com/6962928.html>. [Consulta: 27 de febrero del 2009].

Wallace, O. 2006. 2-substituted 1,2,3,4-tetrahydroquinolines and derivatives thereof, compositions and methods. United States Eli Lilly and Company (Indianapolis, IN, US). <http://www.freepatentsonline.com/7056931.html> [Consulta: 27 de febrero del 2009].

<http://biotech.icmb.utexas.edu/botany/tax.html> [Consulta: 03 de febrero de 2009].

<http://www.staff.ncl.ac.uk/i.r.hardcastle/antibiotics.html> [Consulta: 03 de febrero de 2009].

<http://www.cancerquest.org/images/Drugs/gemcitabine.gif> [Consulta: 03 de febrero de 2009].





## 8.- ANEXOS

### ANEXO 1.-

**Tabla. 8.-** Resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad (CI<sub>50</sub> expresada en  $\mu\text{M}$ ) para las líneas celulares tumorales y los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos.

Compuesto	Líneas celulares tumorales		Fibroblastos Dérmicos *
	MCF-7	SKBR3	
(4) DM5	21,77 $\pm$ 1,06	64,27 $\pm$ 0,08	48,55 $\pm$ 0,36
(5) DM1	7,71 $\pm$ 1,03	62,62 $\pm$ 0,03	45,46 $\pm$ 1,01
(6) DM6	35,45 $\pm$ 1,22	69,89 $\pm$ 1,09	64,28 $\pm$ 1,29
(7) DM8	85,58 $\pm$ 1,00	71,58 $\pm$ 0,02	53,11 $\pm$ 1,01
(8) DM7	41,16 $\pm$ 1,00	66,56 $\pm$ 0,21	64,29 $\pm$ 0,02
(9) DM12	11,30 $\pm$ 1,14	15,55 $\pm$ 0,06	143,46 $\pm$ 0,51
(10) DM13	32,38 $\pm$ 1,18	129,78 $\pm$ 1,58	44,39 $\pm$ 2,41
(11) DM9	63,84 $\pm$ 1,02	113,06 $\pm$ 4,27	52,97 $\pm$ 0,24
(12) DM15	33,58 $\pm$ 1,11	25,40 $\pm$ 0,02	45,86 $\pm$ 0,86
Isoeugenol	120,95 $\pm$ 0,1	171,13 $\pm$ 1,1	180,63 $\pm$ 3,8
Adriamicina	0,40 $\pm$ 0,50	0,90 $\pm$ 0,8	1,33 $\pm$ 1,37
Taxol	0,16 $\pm$ 0,03	1,21 $\pm$ 0,22	0,59 $\pm$ 0,06
Gemcitabina	0,10 $\pm$ 0,11	9,21 $\pm$ 0,02	4,30 $\pm$ 0,01



**ANEXO 2.-**

**Tabla 9.-** Porcentajes de citotoxicidad obtenidos para cada uno de los compuestos del grupo 2,4-DAr-THQs sobre las líneas celulares tumorales y cultivos primarios de fibroblastos dérmicos. Las tablas se encuentran divididas en los tres grupos descritos en el texto.

Concentración (µg/mL)	% de Citotoxicidad											
	DM5			DM1			DM6			DM8		
	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>
1	17,98	0,00	13,91	22,65	0,00	4,13	0,00	0,00	2,92	0,00	0,00	1,32
5	37,44	0,00	16,07	55,55	0,00	9,53	0,94	0,00	2,69	0,00	0,00	2,62
15	88,10	39,44	41,18	69,84	18,47	33,68	50,17	0,00	2,53	2,50	13,18	19,93
25	92,63	57,34	81,34	71,11	53,18	63,37	64,67	35,98	47,08	31,61	43,35	70,83
50	90,56	59,89	85,56	76,77	66,67	72,33	72,39	68,49	59,65	79,67	79,88	85,43
80	93,32	88,66	89,74	81,5	85,87	78,27	81,13	73,74	69,98	93,2	88,51	87,04
100	93,32	88,98	91,19	87,22	89,02	87,55	83,78	82,50	74,39	93,69	89,06	87,66

Concentración (µg/mL)	% de Citotoxicidad								
	DM7			DM12			DM13		
	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>
1	7,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5	8,58	8,37	0,00	48,22	17,53	9,98	25,35	0,00	0,00
15	33,57	32,39	8,36	92,07	88,27	21,31	45,98	3,10	67,58
25	86,05	47,97	40,82	92,17	88,71	23,73	64	5,11	71,21
50	89,00	64,64	83,70	92,98	89,56	37,15	73,58	17,65	73,94
80	90,16	85,44	87,26	93,07	90,23	75,62	84,00	84,86	74,14
100	91,13	86,38	90,44	96,30	91,85	76,29	85,30	85,98	76,11



## ....CONTINUACIÓN ANEXO 2

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	% de Citotoxicidad					
	DM9			DM15		
	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>	<i>MCF-7</i>	<i>SKBR3</i>	<i>FIBRO</i>
1	0,00	0,00	11,40	1,46	0,00	0,00
5	6,55	0,00	12,97	6,38	9,82	5,85
15	17,66	0,00	36,45	36,57	52,08	74,18
25	50,18	13,76	58,85	59,15	68,13	76,90
50	85,84	58,30	84,98	59,57	72,79	80,62
80	93,16	88,26	86,88	65,51	72,91	80,62
100	93,65	89,89	87,36	68,03	73,59	81,96



**ANEXO 3.-**

**Tabla 10.-** Concentraciones utilizadas en cada una de los ensayos de combinación de compuestos sintéticos con los fármacos antitumorales Taxol y Gemcitabina. Tabla **a)** Línea celular tumoral MCF-7; **b)** Línea celular tumoral SKBR3; **c)** Cultivo primario de fibroblastos dérmicos (Células control).

<b>a)</b> Combinación	<b>CONCENTRACIONES UTILIZADAS EXPRESADAS EN <math>\mu\text{g/mL}</math></b>				
DM5 + TAXOL	$5 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-3}$	$19 \times 10^{-3}$	$37 \times 10^{-3}$	$74 \times 10^{-3}$
DM5 + GEMCITABINA	$1 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	$8 \times 10^{-3}$	$16 \times 10^{-3}$
DM8 + TAXOL	$1 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-3}$	$18 \times 10^{-3}$
DM8 + GEMCITABINA	$2 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-4}$	$1 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$
DM12 + TAXOL	$7 \times 10^{-3}$	$14 \times 10^{-3}$	$28 \times 10^{-3}$	$57 \times 10^{-3}$	$114 \times 10^{-3}$
DM12 + GEMCITABINA	$2 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-3}$	$12 \times 10^{-3}$	$24 \times 10^{-3}$
<b>b)</b> Combinación	<b>CONCENTRACIONES UTILIZADAS EXPRESADAS EN <math>\mu\text{g/mL}</math></b>				
DM5 + TAXOL	$12 \times 10^{-3}$	$23 \times 10^{-3}$	$46 \times 10^{-3}$	$93 \times 10^{-3}$	$186 \times 10^{-3}$
DM5 + GEMCITABINA	$31 \times 10^{-3}$	$62 \times 10^{-3}$	$124 \times 10^{-3}$	$249 \times 10^{-3}$	$497 \times 10^{-3}$
DM8 + TAXOL	$27 \times 10^{-3}$	$54 \times 10^{-3}$	$107 \times 10^{-3}$	$214 \times 10^{-3}$	$428 \times 10^{-3}$
DM8 + GEMCITABINA	$10 \times 10^{-3}$	$20 \times 10^{-3}$	$40 \times 10^{-3}$	$80 \times 10^{-3}$	$160 \times 10^{-3}$
DM12 + TAXOL	$38 \times 10^{-3}$	$76 \times 10^{-3}$	$152 \times 10^{-3}$	$304 \times 10^{-3}$	$609 \times 10^{-3}$
DM12 + GEMCITABINA	$102 \times 10^{-3}$	$204 \times 10^{-3}$	$408 \times 10^{-3}$	$815 \times 10^{-3}$	1,63
<b>c)</b> Combinación	<b>CONCENTRACIONES UTILIZADAS EXPRESADAS EN <math>\mu\text{g/mL}</math></b>				
DM5 + TAXOL	$7 \times 10^{-3}$	$15 \times 10^{-3}$	$30 \times 10^{-3}$	$60 \times 10^{-3}$	$119 \times 10^{-3}$
DM5 + GEMCITABINA	$19 \times 10^{-3}$	$38 \times 10^{-3}$	$77 \times 10^{-3}$	$154 \times 10^{-3}$	$308 \times 10^{-3}$
DM8 + TAXOL	$7 \times 10^{-3}$	$13 \times 10^{-3}$	$26 \times 10^{-3}$	$52 \times 10^{-3}$	$105 \times 10^{-3}$
DM8 + GEMCITABINA	$17 \times 10^{-3}$	$34 \times 10^{-3}$	$67 \times 10^{-3}$	$135 \times 10^{-3}$	$270 \times 10^{-3}$
DM12 + TAXOL	$2 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	$9 \times 10^{-3}$	$17 \times 10^{-3}$	$34 \times 10^{-3}$
DM12 + GEMCITABINA	$6 \times 10^{-3}$	$11 \times 10^{-3}$	$22 \times 10^{-3}$	$44 \times 10^{-3}$	$88 \times 10^{-3}$